

**CÁSSIA TIEMI NEMOTO SANADA**

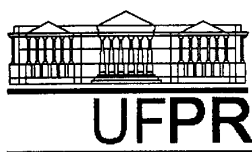
**PRODUÇÃO DE  $\alpha$ -GALACTOSIDASE A PARTIR DE VINHAÇA DE SOJA**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre ao Programa de Pós-Graduação em Processos Biotecnológicos, Setor de Tecnologia da Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Ricardo Soccol

Coorientador: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Michele Rigon Spier

**CURITIBA  
2009**



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
Programa de Pós-Graduação em Processos Biotecnológicos  
Setor de Tecnologia

## RELATÓRIO DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Universidade Federal do Paraná  
Setor de Tecnologia  
Curso de Doutorado em Processos  
Biotecnológicos

Aos cinco dias do mês de junho de 2009, no Salão Nobre do Setor de Tecnologia, segundo andar do Prédio da Administração do Centro Politécnico da Universidade Federal do Paraná, Jardim das Américas, foi instalada pelo Prof Dr Carlos Ricardo Soccol, Coordenador do Curso de Pós-Graduação em Processos Biotecnológicos, a banca examinadora para a Trigesima Primeira Defesa de Dissertação de Mestrado, área de concentração: Agroindústria. Estiveram presentes no Ato, além do Coordenador do Curso de Pós-Graduação, professores, alunos e visitantes.

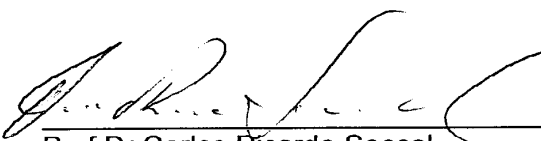
A Banca Examinadora, atendendo determinação do colegiado do Curso de Pós-Graduação em Processos Biotecnológicos, ficou constituída pelos Professores Doutores Débora Brand (UFPR), Luciana Porto de Souza Vandenberghe (UFPR), Michele Rigon Spier (UFPR) e Carlos Ricardo Soccol (UFPR – orientador da dissertação).

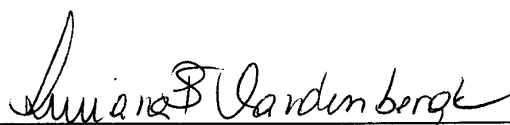
Às 9h00, a banca iniciou os trabalhos, convidando a candidata **Cassia Tiemi Nemoto Sanada** a fazer a apresentação da Dissertação intitulada: “**Produção de  $\alpha$ -Galactosidase a Partir de Vinhaça de Soja**”. Encerrada a apresentação, iniciou-se a fase de arguição pelos membros participantes.

Tendo em vista a dissertação e a arguição, a banca composta pelos professores Dr<sup>a</sup> Débora Brand, Dr<sup>a</sup> Luciana Porto de Souza Vandenberghe, Dr<sup>a</sup> Michele Rigon Spier e Dr Carlos Ricardo Soccol declarou a candidata Aprovada (de acordo com a determinação dos Artigos 32/33/34/35 da Resolução 13/96 de 23.07.96).

Curitiba, 5 de Junho de 2009.

  
Profª Drª Débora Brand

  
Prof Dr Carlos Ricardo Soccol

  
Profª Drª Luciana P Souza Vandenberghe

  
Profª Drª Michele Rigon Spier

## DEDICATÓRIA

Ao meu esposo Marcelo: Obrigada por estar sempre ao meu  
lado nas horas difíceis e por compreender  
meus momentos de impaciência.

Ao meu querido filho Bruno: Tenho você sempre comigo na  
realização de meus sonhos.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus por esta oportunidade que contribuiu para minha formação pessoal e científica.

Ao meu orientador, professor Dr. Carlos Ricardo Soccol, pela oportunidade de aprendizado e pela contribuição com suas valiosas sugestões.

À minha coorientadora, professora Dr<sup>a</sup>. Michele Rigon Spier, que não mediu esforços para contribuir e ajudar nos experimentos com sua experiência na área de produção e purificação de enzimas.

À professora Dr<sup>a</sup>. Luciana Porto Souza Vandenberghe pelo apoio necessário no início do desenvolvimento deste trabalho.

À estagiária Patrícia Milla Gouvêa pelo seu interesse, dedicação, amizade e companheirismo para a realização deste trabalho.

À colega de trabalho Susan Karp pelo apoio, contribuição, amizade e companheirismo no desenvolvimento dos trabalhos.

Aos colegas do Laboratório de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia: Gerson, Rafael e Carlos pelo auxílio na operacionalização do biorreator, Carol Tiemi pela troca de informações e Augustus pela contribuição na parte da determinação do planejamento experimental.

Aos colegas Marco Aurélio e Marco Antônio do Departamento de Bioquímica pela contribuição na área de purificação de proteínas.

Aos colegas do SENAI CIC, Isabela, Jaime, Alessandra, Carolina, Bárbara, Viviane, Patrícia, Maria Helena, Maria Rosí, Deise e Magali pela força e apoio constantes nos momentos difíceis.

À minha família, incluindo meus pais (Kazumi e Aquemi), sogros (Adolfo e Marina), irmãos (Tina, Érika e Kazu) e cunhados (Harumi, Paulo, Nelson e Binho) pelo apoio e ao mesmo tempo pela compreensão da ausência em alguns momentos.

Ao Programa de Pós-Graduação em Processos Biotecnológicos da Universidade Federal do Paraná, pela oportunidade e contribuição à formação pessoal e científica.

Ao SENAI CIC pela oportunidade de participar deste Programa de Pós-Graduação em Processos Biotecnológicos, em especial ao Gerente Alaer Cardoso Junior.

À Handa e equipe, pela disponibilidade de realização de análises complementares no Laboratório do SENAI-CIC.

Ao Paraná Metrologia, pelo apoio financeiro na aquisição de materiais necessários ao desenvolvimento deste trabalho.

Agradeço a todas as pessoas que de alguma forma fizeram parte desta história, compartilhando comigo meus sentimentos, transmitindo apoio, conhecimento, um sorriso, uma palavra positiva.

## RESUMO

A soja é atualmente um dos produtos agrícolas mais abundantes no Brasil, possui alto valor nutricional e é utilizada como alimento tanto para humanos como para animais. Pode ser consumida na forma de óleo, extrato solúvel (leite), farinha, farelo, proteína texturizada e queijo. Além disso, a soja transformou-se em um insumo importante devido às suas propriedades funcionais. Entretanto, o consumo é limitado pela presença de oligossacarídeos que não são digeridos na mucosa intestinal do homem e animais monogástricos, causando distúrbios gastrointestinais como diarreia, náuseas e flatulência. A enzima  $\alpha$ -galactosidase hidrolisa as ligações  $\alpha$ -galactosídicas dos principais oligossacarídeos presentes nos grãos de soja como rafinose e estaquiose. Este trabalho se desenvolveu com o objetivo de otimizar a produção da enzima  $\alpha$ -galactosidase e realizar um estudo preliminar de sua purificação, utilizando como substrato a vinhaça de soja, um resíduo resultante da fermentação alcoólica do melaço de soja. O melaço de soja é um subproduto da produção de concentrados protéicos como o farelo de soja. A linhagem *Lactobacillus agilis* LPB 56 foi selecionada dentre outras nove por apresentar maior atividade enzimática durante a fermentação em vinhaça de soja. A relação C:N do meio de cultivo para o inóculo à base de vinhaça foi otimizada e ajustada em 6:1 com suplementação de extrato de levedura. Esta relação foi determinada através do balanço da composição físico-química do meio. As variáveis no meio de fermentação, concentração de sólidos solúveis (22 a 38°Brix), relação C:N (2:1 a 14:1) e tamanho do inóculo (8 a 42%) foram investigados para otimização da produção da  $\alpha$ -galactosidase em fermentação submersa realizada em frascos. Os resultados demonstraram que a concentração de 30°Brix no meio, com a relação C:N de 9:1 e tamanho de inóculo de 25% (v/v) foram as melhores condições para a produção de  $\alpha$ -galactosidase. A maior atividade enzimática (11,07 U/mL) foi atingida após 144 h de fermentação em biorreator. Posteriormente, a  $\alpha$ -galactosidase foi parcialmente purificada por precipitação com sulfato de amônio, cromatografias de troca iônica e filtração em gel. A fração enzimática parcialmente purificada foi analisada por eletroforese em gel SDS-PAGE. A  $\alpha$ -galactosidase apresentou atividade ótima em pH 5,0-5,5 e temperatura de 40°C. A  $\alpha$ -galactosidase foi completamente inibida por  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  e  $\text{Mn}^{2+}$ , e parcialmente inibida por  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Ag}^{2+}$  e  $\text{Ca}^{2+}$ . O valor de  $K_M$  para hidrólise do pNPG foi de 1,189 mM.

**Palavras-chave:**  $\alpha$ -galactosidase, *Lactobacillus agilis*, vinhaça de soja, melaço de soja, estaquiose, rafinose, caracterização, purificação parcial.

## ABSTRACT

Soybean is currently one of the most abundant agricultural products in Brazil, presents high nutritional value and is utilized as food and feed product. It can be consumed in the form of oil, soluble extract (milk), flour, bran, textured soy protein and cheese. Moreover, soybean has become an important raw material due to its functional properties. However, consumption is limited by the presence of oligosaccharides that are not digested in the intestinal mucosa of humans and monogastric animals, causing gastrointestinal disorders like diarrhea, nausea and flatulence. The enzyme  $\alpha$ -galactosidase hydrolyzes  $\alpha$ -galactosidic bonds of main oligosaccharides presents in soybean as raffinose and stachyose. This work was developed with the aim of optimizing the production of  $\alpha$ -galactosidase enzyme and performing its partial purification, using as substrate the soybean vinasse, a residue produced by the alcoholic fermentation of soybean molasses. Soybean molasses is a by-product of the protein-concentrate soybean meal production. The strain *Lactobacillus agilis* LPB 56 was selected among nine for presenting the highest enzymatic activity. The C:N relation of the vinasse-based inoculum medium was optimized and adjusted in 6:1 with yeast extract. This relation was determined from physico-chemical composition medium. The variables soluble solids concentration in the fermentation medium (22 to 38°Brix), C:N relation (2:1 to 14:1) and size of inoculum (8 to 42%) were investigated to optimize the production of  $\alpha$ -galactosidase in submerged fermentation in flasks. Results demonstrated that the medium concentration 30°Brix, with a C:N relation 9:1, and size of inoculum 25% (v/v) were the best conditions for  $\alpha$ -galactosidase production. The highest enzyme activity (11.07 U/mL) was achieved after 144 h of fermentation in bioreactor. Subsequently  $\alpha$ -galactosidase was partially purified by precipitation with ammonium sulfate, ion exchange and gel filtration chromatographies. The partially purified enzymatic fraction was analyzed by electrophoresis in SDS-PAGE gel.  $\alpha$ -galactosidase presented optimum activity at pH 5.0-5.5 and temperature 40°C.  $\alpha$ -galactosidase was completely inhibited by  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  and  $\text{Mn}^{2+}$  and partially inhibited by  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Ag}^{2+}$  and  $\text{Ca}^{2+}$ . The value of  $K_M$  for the hydrolysis of pNPG was 1.189 mM.

**Key words:**  $\alpha$ -galactosidase, *Lactobacillus agilis*, soybean vinasse, soybean molasses, stachyose, raffinose, characterization, partial purification.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 –	ESTRUTURA DE $\alpha$ -GALACTOSÍDEOS DE ESTAQUIOSE E RAFINOSE E SÍTOS DE CLIVAGEM PARA $\alpha$ -GALACTOSIDASE E INVERTASE. FONTE: LEBLANC <i>et al.</i> (2004 <sup>a</sup> ).....	21
FIGURA 2 –	(A) ESQUEMA DA CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA; (B) ESQUEMA DA TÉCNICA DE FILTRAÇÃO EM GEL. FONTE: AMERSHAM BIOSCIENCES, 2009.....	26
FIGURA 3 –	FERMENTAÇÃO DA VINHAÇA DE SOJA EM FRASCOS ERLLENMEYER INCUBADOS EM SHAKER PARA SELEÇÃO DE CEPAS.....	34
FIGURA 4 –	AMOSTRA DO MELAÇO DE SOJA FERMENTADO COM <i>Saccharomyces cerevisiae</i> APÓS CENTRIFUGAÇÃO.....	34
FIGURA 5 –	ESQUEMA DO PREPARO DE VINHAÇA DE SOJA EM ESCALA LABORATORIAL.....	35
FIGURA 6 –	CONCENTRAÇÃO DA VINHAÇA DE SOJA EM ROTOEVAPORADOR.....	38
FIGURA 7 –	FERMENTAÇÃO DA VINHAÇA DE SOJA EM ERLLENMEYER INCUBADOS EM SHAKER A 30°C, 120 rpm.....	39
FIGURA 8 –	PRODUÇÃO DE $\alpha$ -GALACTOSIDASE EM BIORREATOR (NEW BRUNSWICK SCIENTIFIC – BIOFLO 110) .....	40
FIGURA 9 –	FLUXOGRAMA DE PURIFICAÇÃO PARCIAL DA ENZIMA $\alpha$ -GALACTOSIDASE.....	40
FIGURA 10 –	PRECIPITAÇÃO DE PROTEÍNAS COM SULFATO DE AMÔNIO.....	41
FIGURA 11 –	DIÁLISE DO PRECIPITADO RESSUSPENDIDO EM TAMPÃO NO INTERIOR DA MEMBRANA DE CELULOSE.....	42
FIGURA 12 –	CROMATOGRAFIA IÔNICA EM TUBO EPPENDORF. (A) EXTRATO BRUTO ADSORVIDO NA RESINA CATIÔNICA; (B) EXTRATO BRUTO ADSORVIDO NA RESINA ANIÔNICA.....	43
FIGURA 13 –	(A) CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA EM COLUNA COM RESINA DEAE-SEPHAROSE; (B) COLUNA DEAE-SEPHAROSE COM AMOSTRA.....	44
FIGURA 14 –	FORMADOR DE GRADIENTE E AGITADOR.....	44
FIGURA 15 –	FRAÇÕES ELUÍDAS DA CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA (DEAE-SEPHAROSE) NO COLETOR.....	45
FIGURA 16 –	DIÁLISE DAS FRAÇÕES ELUÍDAS DA CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA (DEAE-SEPHAROSE) .....	45
FIGURA 17 -	CROMATOGRAFIA DE FILTRAÇÃO EM GEL UTILIZANDO COLUNA DE AGAROSE SUPEROSE 6.....	46
FIGURA 18 –	TÉCNICA DE ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA 12,5% EM SISTEMA VERTICAL.....	47
FIGURA 19 –	SONICADOR (BANDELIN, SONOPULS HD2070) UTILIZADO PARA O ROMPIMENTO DE CÉLULAS.....	51
FIGURA 20 –	VISUALIZAÇÃO DO <i>L. agilis</i> EM MICROSCÓPIO ÓPTICO (AUMENTO DE 1000x) .....	56



FIGURA 21 –	CRESCIMENTO CELULAR DA CEPA <i>L. agilis</i> LPB 56 (UFC/mL).....	56
FIGURA 22 –	CINÉTICA DE CRESCIMENTO DO <i>L. agilis</i> LPB 56 NO MEIO DE CULTIVO COM BASE EM VINHAÇA SUPLEMENTADO COM EXTRATO DE LEVEDURA EM DIFERENTES RELAÇÕES C:N.....	58
FIGURA 23 –	ATIVIDADE DA $\alpha$ -GALACTOSIDASE NO MEIO DE FERMENTAÇÃO APÓS 72 h COM DIFERENTES FONTES DE NITROGÊNIO E RELAÇÕES C:N NO INÓCULO. * REFERE-SE À ATIVIDADE TOTAL (INTRACELULAR + EXTRACELULAR) .....	59
FIGURA 24 –	DIAGRAMA DE PARETO PARA SELEÇÃO DE EFEITOS SIGNIFICATIVOS NA PRODUÇÃO DE $\alpha$ -GALACTOSIDASE....	60
FIGURA 25 –	SUPERFÍCIE DE RESPOSTA DESCRITA PELO MODELO, APRESENTANDO O EFEITO DOS SÓLIDOS SOLÚVEIS (°BRIX) E A PORCENTAGEM DE INÓCULO (% v/v) NA PRODUÇÃO DE $\alpha$ -GALACTOSIDASE.....	62
FIGURA 26 –	SUPERFÍCIE DE RESPOSTA DESCRITA PELO MODELO, APRESENTANDO O EFEITO DOS SÓLIDOS SOLÚVEIS (°BRIX) E EXTRATO DE LEVEDURA (RELAÇÃO C:N) NA PRODUÇÃO DE $\alpha$ -GALACTOSIDASE.....	62
FIGURA 27 –	SUPERFÍCIE DE RESPOSTA DESCRITA PELO MODELO, APRESENTANDO O EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DO INÓCULO (% v/v) E EXTRATO DE LEVEDURA (RELAÇÃO C:N) NA PRODUÇÃO DE $\alpha$ -GALACTOSIDASE.....	63
FIGURA 28 –	CONSUMO DOS OLIGOSSACARÍDEOS E PRODUÇÃO DA ENZIMA $\alpha$ -GALACTOSIDASE POR FERMENTAÇÃO DE VINHAÇA DE SOJA A 30°BRIX DURANTE 192 h. ATIVIDADE ENZIMÁTICA (▲), CONCENTRAÇÃO DE ESTAQUIOSE (◆) E RAFINOSE (■).....	66
FIGURA 29 –	BALANÇO DE MASSA DO PROCESSO DE PRODUÇÃO DE $\alpha$ -GALACTOSIDASE A PARTIR DE VINHAÇA DE SOJA. PORCENTAGEM EM BASE SECA. ....	66
FIGURA 30 –	PERFIL CROMATOGRÁFICO DE ELUIÇÃO DA $\alpha$ -GALACTOSIDASE DE <i>L. agilis</i> EM COLUNA ANIÔNICA DEAE-SEPHAROSE. ATIVIDADE DE $\alpha$ -GALACTOSIDASE (▲), PERFIL DE PROTEÍNA A 280 nm (—), GRADIENTE DE NaCl (---).....	69
FIGURA 31 –	PERFIL CROMATOGRÁFICO DE ELUIÇÃO DA $\alpha$ -GALACTOSIDASE DE <i>L. agilis</i> EM COLUNA DE FILTRAÇÃO EM GEL SUPEROSE 6. ATIVIDADE DE $\alpha$ -GALACTOSIDASE(▲),D.O. 280 nm (—).....	70

FIGURA 32 -	ELETROFORESE DESNATURANTE (SDS-PAGE 12,5%) DA $\alpha$ -GALACTOSIDASE DE <i>L. agilis</i> CORADO COM COOMASSIE BLUE. 1- MARCADORES DE MASSA MOLECULAR; 2- EXTRATO BRUTO; 3- EXTRATO BRUTO DILUÍDO 1:5; 4- AMOSTRA PRECIPITAÇÃO COM SULFATO DE AMÔNIO 80%; 5- AMOSTRA ANTERIOR LIOFILIZADA; 6 A 8- FRAÇÃO DEAE-SEPHAROSE (5 $\mu$ L, 8 $\mu$ L, 10 $\mu$ L); 9 A 15- FRAÇÃO DEAE-SEPHAROSE LIOFILIZADA (2 $\mu$ L, 4 $\mu$ L, 8 $\mu$ L, 10 $\mu$ L, 12 $\mu$ L, 15 $\mu$ L, 20 $\mu$ L).....	71
FIGURA 33 -	ELETROFORESE DESNATURANTE (SDS-PAGE 12,5 %) DA $\alpha$ -GALACTOSIDASE DE <i>L. agilis</i> CORADO COM COOMASSIE BLUE. 1- MARCADORES DE MASSA MOLECULAR; 2- EXTRATO BRUTO; 3- FRAÇÃO SUPEROSE 6.....	72
FIGURA 34 -	ESTIMATIVA DA MASSA MOLECULAR DA $\alpha$ -GALACTOSIDASE DE <i>L. agilis</i> (85, 65, 37 kDa).....	73
FIGURA 35 -	COMPARAÇÃO DA MASSA MOLECULAR DE: (A) MARCADORES DE MASSA MOLECULAR; (B) prováveis bandas de $\alpha$ -GAL de <i>L. agilis</i> LPB 56, referente a este trabalho (85, 65 e 37 kDa); (C) $\alpha$ -GAL de <i>Bacillus stearothermophilus</i> , 79,9 kDa (GOTE <i>et al.</i> , 2006); (D) $\alpha$ -GAL de <i>Debaryomyces hansenii</i> UFV-1, 60 kDa (VIANA <i>et al.</i> , 2006); (E) $\alpha$ -GAL de <i>Tachigali multijuga</i> , 38 kDa (FIALHO, 2007).....	74
FIGURA 36 -	EFEITO DO pH NA ATIVIDADE DA $\alpha$ -GALACTOSIDASE DE <i>L. agilis</i> LPB 56. ATIVIDADE ENZIMÁTICA MÁXIMA FOI DETERMINADA COMO 100%.....	75
FIGURA 37 -	ESTABILIDADE AO pH DA $\alpha$ -GALACTOSIDASE DE <i>L. agilis</i> LPB 56 POR 72 (♦), 48 (□) E 24 h (▲), APÓS PRÉ-INCUBAÇÃO DA ENZIMA NA FAIXA DE pH DE 3,5 A 6,5. ....	76
FIGURA 38 -	EFEITO DA TEMPERATURA NA ATIVIDADE DA $\alpha$ -GALACTOSIDASE DE <i>L. agilis</i> LPB 56.....	77
FIGURA 39 -	EFEITO DA TEMPERATURA NA ESTABILIDADE DA $\alpha$ -GALACTOSIDASE DE <i>L. agilis</i> LPB 56. A PREPARAÇÃO ENZIMÁTICA FOI PRÉ-INCUBADA POR 60 min A 20°C (□), 30°C (♦), 40°C (Δ), 50°C (●).....	78
FIGURA 40 -	EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DO SUBSTRATO pNPG NA ATIVIDADE DE $\alpha$ -GALACTOSIDASE PRODUZIDA POR <i>L. agilis</i> LBP 56.....	81
FIGURA 41 -	GRÁFICO DO DUPLO RECÍPROCO (LINEWEAVER-BURK) PARA A VELOCIDADE DE REAÇÃO EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE pNPG PARA DETERMINAR OS VALORES DE $K_M$ E $V_{max}$ .....	81

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1	- ESPÉCIES DE BACTÉRIAS LÁTICAS CAPAZES DE CONSUMIR AÇÚCARES DA VINHAÇA.....	23
TABELA 2	- COMPOSIÇÃO MÉDIA DO MELAÇO E VINHAÇA DE SOJA..	31
TABELA 3	- PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL APLICANDO UM DELINEAMENTO PLACKETT-BURMAN.....	36
TABELA 4	- VALORES CODIFICADOS E REAIS REFERENTES ÀS CONDIÇÕES DE CULTURA E COMPOSIÇÃO DO MEIO UTILIZADOS NO DELINEAMENTO PLACKETT-BURMAN.....	37
TABELA 5	- PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL APLICANDO O DELINEAMENTO COMPOSTO CENTRAL ROTACIONAL ( $2^3$ )	37
TABELA 6	- VALORES UTILIZADOS NO DELINEAMENTO COMPOSTO CENTRAL PARA TESTE DE CONCENTRAÇÃO DE SÓLIDOS SOLÚVEIS, TAMANHO DO INÓCULO E CONCENTRAÇÃO DE EXTRATO DE LEVEDURA.....	38
TABELA 7	- ATIVIDADE EXTRACELULAR DA $\alpha$ -GALACTOSIDASE POR NOVE DIFERENTES CEPAS DE BACTÉRIAS LÁTICAS. VALORES EM PARÊNTESES REPRESENTAM AS MÉDIAS DOS DESVIOS PADRÃO.....	55
TABELA 8	- PRODUÇÃO CELULAR ( $\times 10^8$ UFC/mL) NA VINHAÇA EM 12 h PARA DIFERENTES FONTES DE NITROGÊNIO E RELAÇÕES C:N.....	58
TABELA 9	- ATIVIDADES DE $\alpha$ -GALACTOSIDASE PARA AS DIFERENTES CONDIÇÕES DE CULTURA E COMPOSIÇÕES DO MEIO APÓS 72 h DE FERMENTAÇÃO.	60
TABELA 10	- ATIVIDADES DE $\alpha$ -GALACTOSIDASE OBTIDAS APÓS 72 h DE FERMENTAÇÃO PARA DIFERENTES CONDIÇÕES DE CULTURA E COMPOSIÇÕES DO MEIO UTILIZADOS PARA O DELINEAMENTO COMPOSTO CENTRAL ROTACIONAL..	61
TABELA 11	- IDENTIFICAÇÃO DE VARIÁVEIS SIGNIFICATIVAS ( $p < 0,05$ ) PARA A PRODUÇÃO DE $\alpha$ -GALACTOSIDASE UTILIZANDO DELINEAMENTO COMPOSTO CENTRAL ROTACIONAL .....	63
TABELA 12	- EXPERIMENTOS PARA VERIFICAÇÃO DO MODELO PREVISTO DE PRODUÇÃO DE $\alpha$ -GALACTOSIDASE. OS RESULTADOS REPRESENTAM A MÉDIA DAS DUPLICATAS.....	64
TABELA 13	- ESTUDO CINÉTICO PARA PRODUÇÃO DE $\alpha$ -GALACTOSIDASE, BIOMASSA E ÁCIDO LÁTICO E CONSUMO DE AÇÚCAR.....	65
TABELA 14	- ATIVIDADE ENZIMÁTICA RELATIVA AO EXTRATO BRUTO APÓS PRECIPITAÇÃO COM SULFATO DE AMÔNIO.....	67
TABELA 15	- EXPERIMENTOS PRÉVIOS PARA OTIMIZAÇÃO DOS PARÂMETROS DA CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA EM COLUNA ANIÔNICA (DEAE-SEPHAROSE).....	68
TABELA 16	- RESUMO DOS RESULTADOS DE PURIFICAÇÃO.....	70
TABELA 17	- ESTABILIDADE DA ENZIMA APÓS REFRIGERAÇÃO E CONGELAMENTO.....	79
TABELA 18	- EFEITO DE ÍONS SOBRE A ATIVIDADE DA $\alpha$ -GALACTOSIDASE.....	80

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

atm	– Atmosfera
°Brix	– Concentração de sólidos solúveis
BSA	– Albumina sérica bovina
C:N	– Relação carbono e nitrogênio
DBO	– Demanda bioquímica de oxigênio
DCCR	– Delineamento composto central rotacional
DEAE	– Dietilaminoetil
D.O.	– Densidade óptica
DP	– Desvio padrão
DQO	– Demanda química de oxigênio
DSMZ	– <i>Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen</i>
EDTA	– Ácido etilenodiaminotetracético
FAT	– Fundação André Tosello
GRAS	– Generally Regarded as safe
HPLC	– <i>High Performance Liquid Chromatography</i>
kDa	– Kilodalton
MRS	– <i>Man-Rogosa-Sharpe</i>
m/v	– Massa/volume
N	– Normal
NRRL	– Northern Regional Research Laboratory
PAGE	– Eletroforese em gel de poliacrilamida
PB	– Plackett-Burman
PI	– Ponto isoelétrico
pNPG	– p-nitrofenil- $\alpha$ -D-galactopiranosídeo
pNP	– p-nitrofenol
PVDF	– Polyvinylidene fluoride
rpm	– Rotação por minuto
SDS	– Dodecil sulfato de sódio
SP	– Sulfopropil
TEMED	– N,N,N,N-tetrametil-etilenodiamino de sódio
Tris	– Tris (hidroximetil) aminometano

TS	– Trypticase soy
U	– Unidade de atividade enzimática
UFC/mL	– Unidades formadoras de colônia/mililitro
v/v	– Volume/volume
μm	– Micrometro
μmol	– Micromol

## LISTA DE SÍMBOLOS

$\text{CaCl}_2$	– Cloreto de cálcio
$\text{CaCO}_3$	– Carbonato de cálcio
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	– Sulfato de ferro hepta-hidratado
$\text{HCl}$	– Ácido clorídrico
$\text{KOH}$	– Hidróxido de potássio
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	– Fosfato dihidróxido de potássio
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	– Fosfato hidróxido dipotássio
M	– Molar
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	– Sulfato de magnésio hepta-hidratado
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	– Sulfato de manganês monohidratado
N	– Normal
$K_M$	– Constante de Michaelis-Menten
[S]	– Concentração de substrato
$V_0$	– Velocidade inicial
$V_{\text{máx}}$	– Velocidade máxima
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	– Sulfato de zinco hepta-hidratado

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>17</b>
1.1 OBJETIVO PRINCIPAL.....	19
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	19
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>20</b>
2.1 GALACTOSIDASES.....	20
2.1.1. $\alpha$ -Galactosidases.....	20
2.2. PRODUÇÃO DA $\alpha$ -GALACTOSIDASE POR MICRO-ORGANISMOS.....	21
2.3. BACTÉRIAS LÁTICAS.....	22
2.4. PURIFICAÇÃO DAS $\alpha$ -GALACTOSIDASES.....	24
2.4.1. Precipitação por sais.....	25
2.4.2. Diálise.....	25
2.4.3. Cromatografia de troca iônica.....	25
2.4.4. Cromatografia de filtração em gel.....	26
2.4.5. Eletroforese em gel de poliacrilamida.....	27
2.4.5.1. Eletroforese com SDS.....	27
2.5. APLICAÇÃO DAS $\alpha$ -GALACTOSIDASES EM PROCESSOS INDUSTRIAIS.....	28
2.5.1. Indústria de alimentos.....	28
2.5.2. Indústria de ração animal.....	29
2.5.3. Indústria de papel.....	30
2.6. VINHAÇA DE SOJA.....	30
2.7. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	31
2.7.1. Delineamento Plackett & Burman (PB) .....	32
2.7.2. Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) .....	32
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>33</b>
3.1. SELEÇÃO DE CEPAS PARA A PRODUÇÃO DE $\alpha$ -GALACTOSIDASE.....	33
3.2. PREPARAÇÃO DO MEIO DE FERMENTAÇÃO À BASE DE VINHAÇA DE SOJA PARA A PRODUÇÃO DE $\alpha$ -GALACTOSIDASE.....	34
3.3. EFEITO DE DIFERENTES FONTES DE NITROGÊNIO E RELAÇÕES C:N NO CRESCIMENTO CELULAR E NA PRODUÇÃO DE $\alpha$ -GALACTOSIDASE NO INÓCULO.....	35

3.4. OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE CULTURA E COMPOSIÇÃO DO MEIO PARA A PRODUÇÃO DE $\alpha$ -GALACTOSIDASE.....	36
3.4.1. Seleção das condições de cultura e composição do meio que afetam a produção de $\alpha$ -galactosidase aplicando um delineamento Plackett-Burman.....	36
3.4.2. Otimização das condições de cultura e composição do meio que afetam a produção de $\alpha$ -galactosidase utilizando DCCR (Delineamento Composto Central Rotacional) .....	37
3.5. PRODUÇÃO DE $\alpha$ -GALACTOSIDASE EM BIORREATOR SOB CONDIÇÕES OTIMIZADAS EM FRASCOS.....	39
3.6. PURIFICAÇÃO PARCIAL DA $\alpha$ -GALACTOSIDASE.....	40
3.6.1. Precipitação com sulfato de amônio.....	41
3.6.2. Diálise.....	41
3.6.3. Cromatografia de troca iônica.....	42
3.6.3.1. Experimentos prévios para otimização da cromatografia de troca iônica em microtubos eppendorf.....	42
3.6.3.2. Cromatografia de troca iônica em coluna.....	43
3.6.4. Cromatografia de filtração em gel.....	45
3.6.5. Eletroforese.....	46
3.6.5.1. Coloração dos géis de eletroforese.....	48
3.7. CARACTERIZAÇÃO ENZIMÁTICA.....	48
3.7.1. Efeito do pH na atividade da $\alpha$ -galactosidase.....	48
3.7.2. Efeito do pH na estabilidade da $\alpha$ -galactosidase.....	48
3.7.3. Efeito da temperatura na atividade da $\alpha$ -galactosidase.....	49
3.7.4. Análise de termoestabilidade.....	49
3.7.5. Efeito do congelamento e refrigeração na estabilidade da $\alpha$ -galactosidase.....	49
3.7.6. Efeito de íons metálicos na atividade da $\alpha$ -galactosidase.....	49
3.7.7. Determinação das constantes de Michaelis-Menten ( $K_M$ ) e da velocidade máxima ( $V_{max}$ ) .....	50
3.8. MÉTODOS ANALÍTICOS.....	51
3.8.1. Determinação do teor de sólidos solúveis ( $^{\circ}$ Brix), concentração celular e rompimento de células.....	51
3.8.2. Determinação da atividade enzimática .....	52
3.8.3. Quantificação de açúcares e ácido láctico.....	52
3.8.4. Determinação da concentração de proteína no extrato enzimático .....	53
3.8.5. Determinação de células viáveis .....	53
3.8.6. Determinação de biomassa por peso seco.....	53
3.8.7. Determinação da densidade ótica (DO) do extrato enzimático.....	54



3.8.8. Identificação do micro-organismo.....	54
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>55</b>
4.1. SELEÇÃO DE CEPAS PARA A PRODUÇÃO DE $\alpha$ -GALACTOSIDASE.....	55
4.2. OTIMIZAÇÃO DO PREPARO DO INÓCULO.....	56
4.2.1. Cinética do crescimento celular em MRS e vinhaça de soja.....	56
4.2.2. Suplementação do meio para inóculo à base de vinhaça com diferentes fontes de nitrogênio e relações C:N.....	57
4.3. OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE CULTURA E COMPOSIÇÃO DO MEIO PARA A PRODUÇÃO DE $\alpha$ -GALACTOSIDASE .....	59
4.3.1. Seleção das condições de cultura e composição do meio que afetam a produção de $\alpha$ -galactosidase utilizando o Delineamento Plackett-Burman (PB) ...	59
4.3.2. Otimização das condições de cultura e composições do meio que afetam a produção de $\alpha$ -galactosidase utilizando Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) .....	61
4.4. PRODUÇÃO DE $\alpha$ -GALACTOSIDASE EM BIORREATOR SOB CONDIÇÕES OTIMIZADAS .....	64
4.5. BALANÇO DE MASSA.....	66
4.6. PURIFICAÇÃO PARCIAL DA $\alpha$ -GALACTOSIDASE.....	67
4.6.1. Precipitação com sulfato de amônio e diálise.....	67
4.6.2 Cromatografia de troca iônica e filtração em gel.....	68
4.6.2.1. Otimização da cromatografia de troca iônica em microtubos eppendorf...	68
4.6.2.2. Purificação em colunas.....	69
4.6.3. Eletroforese.....	71
4.7. CARACTERIZAÇÃO ENZIMÁTICA.....	74
4.7.1. Efeito do pH na atividade da $\alpha$ -galactosidase.....	74
4.7.2. Efeito do pH na estabilidade da $\alpha$ -galactosidase.....	75
4.7.3. Efeito da temperatura na atividade da $\alpha$ -galactosidase.....	77
4.7.4. Análise de termoestabilidade.....	78
4.7.5. Efeito do congelamento e refrigeração na atividade da $\alpha$ -galactosidase.....	79
4.7.6. Efeito de íons metálicos na atividade da $\alpha$ -galactosidase.....	79
4.7.7. Determinação das constantes de Michaelis-Menten ( $K_M$ ) e da velocidade máxima ( $V_{max}$ ) .....	81
<b>5. CONCLUSÕES.....</b>	<b>83</b>
<b>6. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....</b>	<b>85</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>86</b>
<b>APÊNDICES.....</b>	<b>93</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A enzima  $\alpha$ -D-galactosil galactohidrolase (EC 3.2.1.22), também conhecida como  $\alpha$ -galactosidase,  $\alpha$ -gal catalisa a hidrólise de ligações  $\alpha$ -1,6-galactosídicas, liberando  $\alpha$ -D-galactose. Estas ligações são encontradas em oligossacarídeos como melibiose, rafinose e estaquiose presentes na maioria das leguminosas, os quais estão associados à flatulência de animais monogástricos e humanos (SUAREZ *et al.*, 1999).

Os açúcares rafinose ( $\alpha$ -D-galactopiranosil-(1,6)- $\alpha$ -D-glicopiranosil- $\beta$ -D-frutoranosídeo) e estaquiose ( $\alpha$ -D-galactopiranosil-(1,6)- $\alpha$ -D-galactopiranosil-(1,6)- $\alpha$ -D-glicopiranosil- $\beta$ -D-frutofuranosídeo) são os principais responsáveis por esses sintomas (WAGNER *et al.*, 1976).

A ausência da enzima no trato intestinal humano e de outros animais monogástricos impede a hidrólise da rafinose, estaquiose, presentes na soja e em outras leguminosas como feijão (STEGGERDA *et al.*, 1966).

Desta forma, estes galacto-oligossacarídeos presentes nas leguminosas restringem o consumo destes grãos como fonte proteica e de outros nutrientes. Com o objetivo de viabilizar a aceitação da soja na alimentação e minimizar os distúrbios digestivos, encontram-se vários estudos para reduzir o teor dos oligossacarídeos. Na literatura, autores testaram vários métodos como cozimento dos grãos (PUGALENTI *et al.*, 2006; SAT e KELES, 2002), hidratação dos grãos (MULYOWIDARSO *et al.*, 1991), germinação (REDDY e SALUNKHE, 1980), extração dos galacto-oligossacarídeos com água e cozimento (KU *et al.*, 1976), extração com etanol (MARTÍNEZ-VILLALUENGA *et al.*, 2006) e tratamento enzimático (CRUZ *et al.*, 1981; MULIMANI *et al.*, 1997).

As  $\alpha$ -galactosidases são aplicadas em processos biocatalíticos para melhorar produtos destinados à alimentação humana e também como componente em dietas animais para aumentar a digestibilidade e reduzir os distúrbios gastro-intestinais.

Estudos nutricionais utilizando preparações de  $\alpha$ -galactosidase como suplementos de ração animal monogástricos demonstraram aumento significativo do peso em decorrência do aumento da digestibilidade de suínos e aves. Indústrias de alimentos, especialmente do setor de derivados de soja têm grande interesse na redução dos galacto-oligossacarídeos, que são resistentes ao calor e portanto, não

são eliminados durante o processo convencional (SAID e PIETRO, 2004). MULIMANI *et al.* (1997) reportaram que o tratamento de farinha de soja com  $\alpha$ -galactosidase bruta reduziu o conteúdo de rafinose e estaquiose em 90,4% e 91,9%, respectivamente.

As  $\alpha$ -galactosidases estão amplamente distribuídas nos micro-organismos, plantas e animais (SAID e PIETRO, 2004). Micro-organismos são capazes de produzir  $\alpha$ -galactosidases com alto rendimento. A produção desta enzima por fungos, leveduras e bactérias, consiste no crescimento do micro-organismo em um meio seletivo, geralmente contendo uma fonte de carbono indutora da produção da enzima. Açúcares como galactose, melibiose, rafinose e estaquiose já foram descritos como indutores da produção da  $\alpha$ -galactosidase (REZENDE *et al.*, 2005).

Bactérias ácido lácticas como *Lactobacillus plantarum*, *L. fermentum*, *L. brevis*, *L. buchneri* e *L. reuteri* são capazes de hidrolisar  $\alpha$ -galactoligossacarídeos em carboidratos digeríveis durante fermentações de vegetais (CRUZ *et al.*, 1981). Recentemente a caracterização de genes envolvidos na hidrólise de  $\alpha$ -galactoligossacarídeos por *Lactococcus raffinolactis* foi descrito (LEBLANC *et al.*, 2005).  $\alpha$ -Galactosidases de bactérias também incluem *Lactobacillus fermentum* (GARRO *et al.*, 1996) e *Bacillus stearothermophilus* (GOTE *et al.*, 2004), e enzimas de origem fúngica podem ser produzidas por *Aspergillus fumigatus* (REZENDE *et al.*, 2005), *Humicola* sp. (KOTWAL *et al.*, 1998) e *Aspergillus niger* (MANZANARES *et al.*, 1998). As bactérias lácticas têm a grande vantagem de serem classificadas como GRAS cujo status representa organismos que não oferecem riscos de toxicidade e patogenicidade, o que permite sua utilização na indústria de alimentos (SAID e PIETRO, 2004).

Neste trabalho foi utilizada a vinhaça de soja como substrato para a produção e caracterização de  $\alpha$ -galactosidase de bactérias lácticas. A vinhaça, rica em carboidratos, é um subproduto gerado a partir da recuperação do álcool produzido pela fermentação alcoólica do melaço de soja, resíduo industrial, resultante da extração dos açúcares do farelo de soja desengordurado.

## 1.1 OBJETIVO PRINCIPAL

O principal objetivo deste trabalho foi o desenvolvimento de um bioprocesso para a produção e purificação parcial da enzima  $\alpha$ -galactosidase em fermentação submersa utilizando vinhaça de soja como substrato.

## 1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1.2.1. Selecionar, dentre nove linhagens disponíveis no banco de culturas do laboratório do Departamento de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia da UFPR e demais bancos internacionais, aquela com maior capacidade de sintetizar a enzima  $\alpha$ -galactosidase;
- 1.2.2. Otimizar o processo de produção da  $\alpha$ -galactosidase em frascos com a linhagem selecionada;
- 1.2.3. Realizar o estudo da cinética da produção da enzima em condições otimizadas em biorreator do tipo bancada (14L);
- 1.2.4. Realizar um estudo preliminar para a purificação da enzima  $\alpha$ -galactosidase;
- 1.2.5. Realizar a caracterização da  $\alpha$ -galactosidase parcialmente purificada.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 GALACTOSIDASES

As enzimas galactosidases pertencem à classe das hidrolases, são glicosidases que hidrolisam compostos contendo O- e S-glicosil. As  $\alpha$ -galactosidases e  $\beta$ -galactosidases constituem um grupo de exoglicosidases que catalisam a clivagem hidrolítica de resíduos terminais de D-galactose em ligação  $\alpha$  e  $\beta$ , respectivamente. Estão amplamente distribuídas na natureza, sendo encontradas em micro-organismos, plantas e animais (SAID e PIETRO, 2004).

#### 2.1.1. $\alpha$ -Galactosidases

$\alpha$ -Galactosidases foram primeiramente designadas como melibiases por apresentarem atividade hidrolítica sobre o dissacarídeo melibiose. A alteração do nome da enzima para  $\alpha$ -galactosidase deu-se a partir de estudos da sua especificidade de ação usando vários açúcares contendo resíduos terminais não redutores de  $\alpha$ -D-galactosil. As  $\alpha$ -galactosidases hidrolisam resíduos de  $\alpha$ -D-galactose no terminal não redutor de  $\alpha$ -D-galactosídeos, incluindo galacto-oligossacarídeos, galactomananas e outros polissacarídeos (DEY e PRIDHAM, 1972).

A hidrólise enzimática dos galacto-oligossacarídeos é realizada pela catálise das enzimas  $\alpha$ -galactosidases que são específicas para ligações  $\alpha$ -1,6 que une os resíduos de galactose à sacarose, rafinose, estaquiose e verbascose (possui uma unidade de galactose a mais que estaquiose), e também por invertases, enzimas específicas para a ligação  $\beta$ -1,2 que une frutose à glicose nos mesmos oligossacarídeos acima citados. Com a hidrólise,  $\alpha$ -galactosidases dão origem à galactose e sacarose e invertases produzem melibiose e frutose (FIGURA 1).

A rafinose é um trissacarídeo composto por três moléculas de hexoses ( $\alpha$ -galactose +  $\alpha$ -glicose +  $\beta$ -frutose), enquanto a estaquiose é um tetrassacarídeo composto por quatro moléculas de hexoses ( $\alpha$ -galactose +  $\alpha$ -galactose +  $\alpha$ -glicose +  $\beta$ -frutose) (LEHNINGER, 2007). O esquema da degradação dos oligossacarídeos, bem como das enzimas envolvidas, está representado também na FIGURA 1.

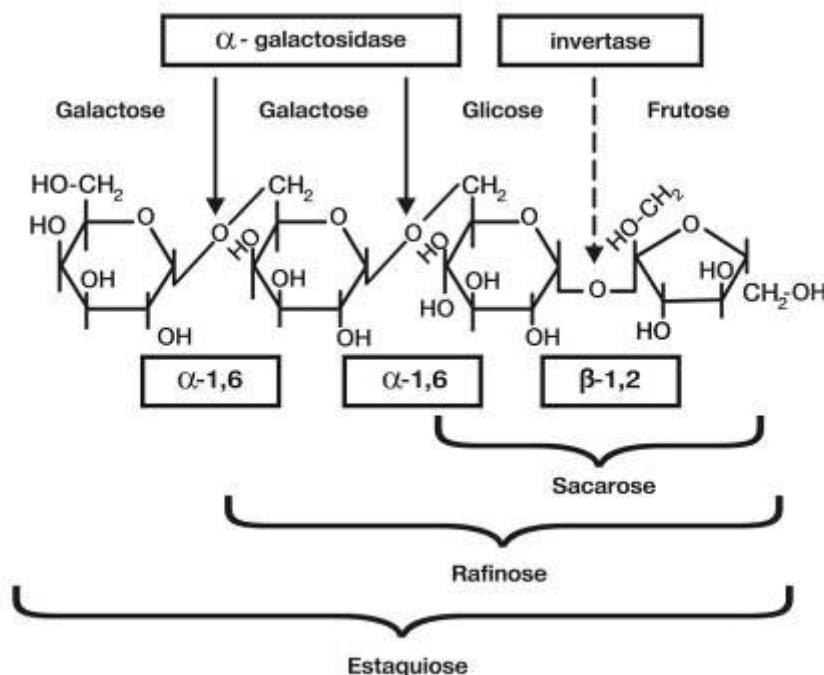


FIGURA 1 – ESTRUTURA DE  $\alpha$ -GALACTOSÍDEOS DE ESTAQUIOSE E RAFINOSE E SÍTOS DE CLIVAGEM PARA  $\alpha$ -GALACTOSIDASE E INVERTASE  
 FONTE: LEBLANC *et al.* (2004<sup>a</sup>)

## 2.2. PRODUÇÃO DA $\alpha$ -GALACTOSIDASE POR MICRO-ORGANISMOS

A produção de  $\alpha$ -galactosidases por micro-organismos como fungos, leveduras e bactérias já foi relatada por vários autores. Na literatura encontra-se, galactosidases fúngicas produzidas principalmente pelos gêneros *Aspergillus* (SHANKAR e MULIMANI, 2007; MANZANARES *et al.*, 1998), *Trichoderma* (SHABALIN *et al.*, 2002), *Streptomyces* (ANISHA *et al.*, 2008). Dentre as leveduras, foram produzidas principalmente por *Saccharomyces* (LAZO *et al.*, 1977). Galactosidases bacterianas já foram obtidas pelos gêneros, *Bacillus* (GOTE *et al.*, 2004<sup>a</sup>), *Lactobacillus* (LE BLANC *et al.*, 2005; GARRO *et al.*, 1996).

Já foram encontradas  $\alpha$ -galactosidases com atividade extracelular como também intracelular. Dentre as  $\alpha$ -galactosidases intracelulares, foram produzidas a partir de leveduras como *Saccharomyces carlsbergensis* (LAZO *et al.*, 1977) e

bactérias como *L. curvatus* R08 (YOON E HWANG, 2008). A maioria dos trabalhos tem apresentado  $\alpha$ -galactosidase com atividade extracelular.

A obtenção de  $\alpha$ -galactosidases vem sendo investigada visando buscar estratégias para a otimização da produção da enzima e sua purificação.

Várias fontes de carbono foram investigadas quanto à influência na produção da  $\alpha$ -galactosidase. Açúcares como galactose, melibiose, rafinose e estaquiose já foram descritos como indutores da atividade da enzima, enquanto a glicose pode reprimir a sua produção. A ocorrência de repressão catabólica ocorre pela presença no meio de altas concentrações de açúcares facilmente assimiláveis como a glicose (LIMA *et al.*, 2001).

Fontes de nitrogênio orgânico e inorgânico têm sido adicionadas no meio de cultivo para a produção de  $\alpha$ -galactosidases. Por exemplo, extrato de levedura foi utilizado por GOTE *et al.* (2004<sup>a</sup>) utilizando *Bacillus stearothermophilus* (NCIM-5146) e VIANA *et al.* (2006) utilizaram sulfato de amônio para produção de  $\alpha$ -galactosidase de *Debaryomyces hansenii* UFV-1.

O pH do meio de crescimento desempenha um papel importante por induzir mudanças morfológicas no organismo e também para a secreção enzimática. Os efeitos do pH na estabilidade de uma enzima devem ser levados em conta no estudo do efeito na ligação do substrato e na catálise (SEGEL, 1979).

Outro fator importante consiste na temperatura que afeta diretamente o crescimento dos micro-organismos e a formação do produto, sendo um dos parâmetros mais frequentemente analisados (SEGEL, 1979).

A intensidade da agitação influencia a mistura dos nutrientes no meio de crescimento e a taxa de transferência de oxigênio (SCHMIDELL *et al.*, 2001).

### 2.3. BACTÉRIAS LÁTICAS

Bactérias ácido lácticas são mais conhecidas como culturas *starter* na produção de produtos lácteos como leite fermentado, iogurte e queijo, além da utilização em processamento de carnes, vegetais e bebidas alcoólicas (CARR *et al.*, 2002).

Em geral, bactérias lácticas podem ser caracterizadas como micro-organismos gram-positivos, aeróbios a anaeróbios facultativos, formato de bacilos e cocos, são oxidase, catalase e benzidina negativas, não possuem citocromos, não reduzem

nitrito a nitrito e são incapazes de utilizar lactato (CARR *et al.*, 2002). Os principais gêneros incluem *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Weissella* e *Vagococcus*.

Quanto ao metabolismo fermentativo, as bactérias lácticas estão classificadas em dois grupos: homofermentativo ou homolático (produz mais de 85% de ácido láctico a partir da glicose) e heterofermentativo (produz 50% de ácido láctico e considerável quantidade de etanol, ácido acético e dióxido de carbono a partir da glicose). Exemplos de bactérias homoláticas incluem os gêneros *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus* e algumas espécies de *Lactobacillus*, enquanto as bactérias de origem heterofermentativa incluem os gêneros *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Weissella*, e algumas espécies de *Lactobacillus* (ROISSART e LUQUET, 1994).

Bactérias ácido lácticas são capazes de consumir açúcares presentes na vinhaça como rafinose e melibiose (TABELA 1).

TABELA 1 – ESPÉCIES DE BACTÉRIAS LÁTICAS CAPAZES DE CONSUMIR AÇÚCARES DA VINHAÇA

GRUPO	ESPÉCIES	RAFINOSE	MELIBIOSE
Estreptobactérias	<i>Lactobacillus agilis</i>	X	X
	<i>Lactobacillus hamsteri</i>	X	X
	<i>Lactobacillus murinus</i>	X	X
	<i>Lactobacillus pentosus</i>	X	X
	<i>Lactobacillus plantarum</i>	X	X
	<i>Lactobacillus barvaricus</i>		X
	<i>Lactobacillus maltaromicus</i>		X
	<i>Lactobacillus sake</i>		X
Termobactérias	<i>Lactobacillus gallinarum</i>	X	X
	<i>Lactobacillus kefiranofaciens</i>	X	X
	<i>Lactobacillus aviarius</i>	X	
	<i>Lactobacillus salivarius</i>	X	X
	<i>Lactobacillus ruminis</i>	X	X
Lactococos	<i>Lactococcus piscium</i>	X	X
	<i>Lactococcus raffinolactis</i>	X	X
Pediococos	<i>Pediococcus urinaeequi</i>	X	

Fonte: CARR *et al.*, (2002); LIU *et al.*, (2003)

Alimentos fermentados por bactérias lácticas são consumidos há muito tempo pelos humanos sem efeitos adversos. Portanto, são potenciais veículos para as enzimas digestivas (LEBLANC *et al.*, 2004<sup>b</sup>).



Bactérias lácticas, incluindo *Lactobacillus plantarum*, *L. fermentum*, *L. brevis*, *L. buchneri*, e *L. reuteri*, utilizam  $\alpha$ -galactosidases na hidrólise de carboidratos digeríveis durante a fermentação de vegetais. Estas bactérias são, portanto, consideradas fontes de  $\alpha$ -galactosidases (CRUZ *et al.*, 1981).

Atividade enzimática intracelular de  $\alpha$ -galactosidase a partir de bactéria ácido láctica (*L. curvatus* R08) foi reportado por Yoon e Hwang (2008).

Do ponto de vista nutricional, o uso de bactérias lácticas para fermentação de alimentos à base de soja, possui efeitos positivos incluindo melhora do aroma devido aos ácidos orgânicos e redução de ácido fítico (KAMALY, 1997).

## 2.4. PURIFICAÇÃO DAS $\alpha$ -GALACTOSIDASES

A escolha das técnicas de purificação está vinculada às propriedades moleculares inerentes a cada enzima. Há um grande número de processos de separação que podem ser utilizados para o fracionamento. O processo deve ser cuidadosamente planejado, preocupando-se com a manutenção da estabilidade da proteína, de forma a obter adequada eficiência, velocidade, rendimento e pureza. (MARSHAK *et al.*, 1996).

Vários métodos de purificação de  $\alpha$ -galactosidases têm sido relatados utilizando técnicas como precipitação (CAO *et al.*, 2007), cromatografia de troca iônica (GARRO *et al.*, 1996), cromatografia de filtração em gel (GARRO *et al.*, 1996) e ultrafiltração (FIALHO, 2007; GOTE *et al.*, 2006).

Estas técnicas têm sido empregadas compondo estratégias de purificação, por exemplo, na purificação de  $\alpha$ -galactosidase de *Rhizopus sp.* por Cao *et al.* (2007), foi utilizada precipitação com sulfato de amônio, seguido de cromatografia de troca aniônica (Q-Sepharose XL) e cromatografia de filtração em gel (Sephacryl S-200). O rendimento final foi de 14,6%. Fialho (2007), utilizou cromatografia de troca iônica (DEAE-Sephacel), ultrafiltração (membrana 10 kDa) e cromatografia de filtração em gel (Sephadex G-150) com rendimento final de 6,16% na purificação de  $\alpha$ -galactosidase de sementes de *tachigali multijuga*. Gote *et al.* (2006) empregou a técnica de concentração através de ultrafiltração, precipitação com etanol, e coluna cromatográfica (Phenil Sepharose CL-4B) com rendimento final de 44,1% na purificação de  $\alpha$ -galactosidase de *Bacillus stearothermophilus* (NCIM-5146).

#### **2.4.1. Precipitação por sais**

A precipitação por sais ocorre por neutralização das cargas superficiais da proteína e redução da camada de hidratação, favorecendo a agregação dos resíduos hidrofóbicos. A precipitação de proteínas sob altas concentrações salinas dá-se o nome de *salting out*. Esta técnica propõe que a adição de determinadas concentrações de sal resulta em aprisionamento das moléculas de água pela solvatação dos íons. As moléculas de água tornam-se escassas e ocorre consumo das moléculas de água ordenadas em torno das regiões hidrofóbicas da proteína, que ficam expostas podendo interagir e se agregar entre si. O aumento da temperatura favorece a precipitação de proteínas, mas o processo é conduzido preferencialmente a 4°C para reduzir o risco de desnaturação (PESSOA JR. *et al.*, 2005).

Segundo Bracht (2003), a precipitação não apresenta elevada capacidade de separação de diferentes proteínas, razão pela qual é considerada um método de moderado poder de purificação.

#### **2.4.2. Diálise**

Consiste em um processo que separa moléculas de acordo com o seu tamanho através do uso de membranas contendo poros de dimensões inferiores aos tamanhos das macromoléculas. Esses poros permitem que moléculas pequenas, tais como solventes, sais e metabólitos pequenos, difundam através da membrana, mais impedem a passagem de moléculas maiores. O material mais comumente usado em diálise é o celofane (acetato de celulose) (BRACHT, 2003).

#### **2.4.3. Cromatografia de troca iônica**

O princípio básico da cromatografia de troca iônica baseia-se na competição entre íons de interesse e contaminantes pelos grupos carregados da matriz ou da fase estacionária (PESSOA JR. *et al.*, 2005).

Esta técnica envolve a adsorção a grupos carregados da resina (FIGURA 2-A), seguida de sua eluição com fracionamento. Enzimas carregam grupos ionizados em sua superfície, devido principalmente aos resíduos de aminoácidos. O

balanço de cargas positivas e negativas depende das quantidades relativas desses grupos carregados e isso varia com o pH. Quando estão em igual número, tem-se o PI (ponto isoelétrico). Acima do PI a enzima possui uma carga negativa e abaixo uma carga positiva. Desta forma, existem matrizes carregadas com grupos positivos como DEAE (dietilaminoetil) chamadas aniônicas e grupos negativos como CM (carboximetil) chamadas de catiônicas (LIMA *et al.*, 2001).

O pH pode ser ajustado para regular o grau de adsorção da enzima pela resina. Uma unidade de pH acima ou abaixo do PI deve ser utilizada para facilitar a adsorção. A eluição normalmente é mais eficiente quando feita através de um gradiente linear, em que o pH ou a força iônica sofre uma mudança contínua (LIMA *et al.*, 2001).

A cromatografia de troca iônica é o método cromatográfico mais utilizado nos processos de purificação de proteínas. Sua popularidade deve-se à sua alta resolução, facilidade de uso, reprodutibilidade e baixo custo (BRACHT, 2003).

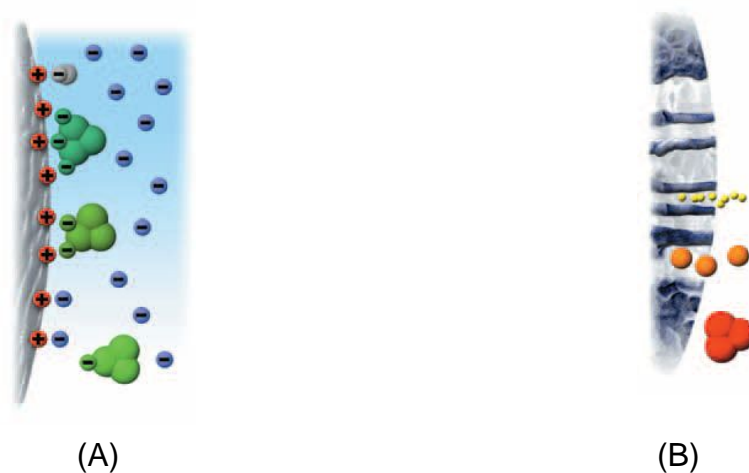


FIGURA 2 – (A) ESQUEMA DA CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA; (B) ESQUEMA DA TÉCNICA DE FILTRAÇÃO EM GEL. FONTE: AMERSHAM BIOSCIENCES, 2009

#### 2.4.4. Cromatografia de filtração em gel

Esta técnica também é conhecida como cromatografia de permeação em gel, cromatografia de exclusão em gel, cromatografia de peneira molecular ou simplesmente cromatografia em gel (BRACHT, 2003).

Na cromatografia de filtração, a resina consiste de minúsculos grãos porosos. As proteínas pequenas entram nos poros e passam mais lentamente pelo leito da

coluna, enquanto que proteínas maiores, que não conseguem entrar nos poros, são levadas para fora da coluna mais rapidamente (BRACHT, 2003).

O princípio básico desse método é que as moléculas sofrem partição, em virtude das diferenças no tamanho das espécies, entre um solvente (fase móvel) e uma fase estacionária de porosidade definida (FIGURA 2-B). Assim, uma mistura de proteínas dissolvidas em solução tamponante adequada flui, por gravidade ou com o auxílio de bombas, por uma coluna preenchida por esferas microscópicas de material polimérico poroso altamente hidratado e inerte, previamente lavado e equilibrado apenas com o tampão (PESSOA JR. *et al.*, 2005).

#### **2.4.5. Eletroforese em gel de poliacrilamida**

O gel de poliacrilamida foi introduzido, como suporte no processo de eletroforese no final da década de 50 e, desde então, vem sendo amplamente utilizado para a separação de macromoléculas. O gel consiste no produto da polimerização da acrilamida e da N,N metileno-bis acrilamida. A formação do gel ocorre por um mecanismo de polimerização vinílica, catalisada pela riboflavina ou pelo persulfato de amônio. Os dois catalisadores participam da geração de radicais livres, que são estabilizados por uma amina terciária, TEMED. Os radicais livres formados reagem com a acrilamida, ativando-a. A acrilamida ativada reage com outras moléculas de acrilamida formando ligações cruzadas intercadeias, produzindo uma longa cadeia linear do polímero. A participação da bis-acrilamida atua formando ligações cruzadas entre as cadeias lineares, originando uma rede que resulta na formação do gel (BRACHT, 2003).

##### **2.4.5.1. Eletroforese com SDS**

A eletroforese em gel de poliacrilamida-dodecilsulfato de sódio (SDS-PAGE) é um procedimento eletroforético que separa as proteínas com base nos seus pesos moleculares. O SDS liga-se às porções hidrofóbicas das proteínas, rompendo suas dobras e permitindo que elas existam em conformação estendida estável. Como resultado, o tamanho do complexo proteína-SDS é proporcional ao seu peso molecular (BRACHT, 2003).

Esta técnica permite medir a mobilidade relativa do agregado detergente-proteína em um campo elétrico em uma matriz que restringe mecanicamente o movimento de macromoléculas (MARSHAK *et al*, 1996).

## **2.5. APLICAÇÃO DAS $\alpha$ -GALACTOSIDASES EM PROCESSOS INDUSTRIAIS**

As  $\alpha$ -galactosidases têm uma grande importância comercial devido à sua utilização em vários processos biocatalíticos aplicados na indústria de alimentos, ração animal e papel. O comércio nacional de enzimas é dependente em sua maioria de importações, tornando o custo susceptível às oscilações cambiais e agregando despesas com transporte.

### **2.5.1. Indústria de alimentos**

A indústria de alimentos, principalmente de derivados de soja, tem grande interesse de redução dos galacto-oligossacarídeos, pois produtos de soja hidrolisados com as  $\alpha$ -galactosidases, apresentam melhores propriedades nutricionais e redução de problemas digestivos, o que contribui para ampliação do mercado consumidor de soja e derivados.

Mulimani *et al.* (1997) realizaram o tratamento de farinha de soja com  $\alpha$ -galactosidase reduzindo o conteúdo de rafinose e estaquiose em 90,4% e 91,9%, respectivamente. Esse tratamento foi realizado através de adição de 50 mL da enzima (1,6 U/mL) em 5 g de farinha de soja, incubação a 50°C durante 4 h. LeBlanc *et al.* (2004<sup>a</sup>), realizaram estudos sobre a redução de oligossacarídeos não digeríveis em leite de soja, com aplicação de bactéria ácido láctica modificada.  $\alpha$ -Galactosidases são também usadas na indústria de açúcar de beterraba, para a hidrólise de rafinose presente no xarope. A rafinose inibe a cristalização da sacarose no xarope de beterraba. Desse modo, a hidrólise enzimática da rafinose aumenta o rendimento de sacarose, promovendo a cristalização normal do açúcar de beterraba (SAID e PIETRO, 2004). A redução de oligossacarídeos de farinha de feijão caupi foi investigada por Somiari e Balogh (1995). O conteúdo inicial de estaquiose e rafinose era de 39,5 e 24,3 g/kg e após tratamento, os níveis de estaquiose e rafinose reduziram para 7,0 e 1,6 g/kg, respectivamente.

Viana *et al.* (2006) reduziram completamente o conteúdo de rafinose e estaquiose no leite de soja após 4 h usando a  $\alpha$ -galactosidase de *Debaryomyces hansenii* UFV1 e no tratamento do melaço de soja, a rafinose e estaquiose foi reduzida em 100% e 50%, respectivamente.

Um processo biotecnológico foi desenvolvido por Yamaguishi *et al.* (2009), para produção de grãos de feijão sem estaquiose. Em 18 h de fermentação por *L. agilis* LPB 56, o conteúdo de estaquiose foi totalmente consumido.

Em humanos, os sintomas causados pela intolerância aos oligossacarídeos de rafinose da dieta podem ser minimizados pelo tratamento com uma cápsula para uso oral de  $\alpha$ -galactosidase de *Aspergillus niger* que recebe o nome comercial de Beano<sup>®</sup> fabricado pela indústria americana AkPharma (SAID e PIETRO, 2004).

### 2.5.2. Indústria de ração animal

Além da grande aplicação de  $\alpha$ -galactosidase para melhorar produtos destinados à alimentação humana, esta enzima tem sido usada como componente em dietas animais para aumentar a digestibilidade e reduzir a fermentação de açúcares não digeríveis. Estudos nutricionais utilizando preparações comerciais de  $\alpha$ -galactosidase para suplementação da ração de animais monogástricos têm mostrado aumento significativo no peso em decorrência de melhoria na digestibilidade das dietas para suínos e aves.

Segundo a ASSOCIAÇÃO AMERICANA DE SOJA (2007), a soja madura das variedades tradicionais contém 1,4% de rafinose e 4,1% de estaquiose, oligossacarídeos não digeríveis pelos animais monogástricos. Em vez de ser digerido, passa diretamente pelo intestino onde as bactérias, ao fermentá-lo, liberam gases que fazem com que o animal se sinta saciado, impedindo a expressão de todo o seu potencial genético.

A formulação de uma ração é voltada principalmente ao fornecimento de alimento com nutrientes necessários para se alcançar alta performance do animal e ao mesmo tempo alcançar custos mínimos. Para isto leva-se em conta a concentração de fatores anti-nutricionais na dieta devido à natureza econômica atrativa de grãos e farelos de proteína como também devido a variação natural no conteúdo de fatores anti-nutricionais na matéria prima. O farelo de soja é a fonte de

proteína mais usada em dietas de aves. Porém, os  $\alpha$ -galactosídeos presentes no farelo podem prejudicar a digestibilidade de nutrientes aumentando a osmolaridade do conteúdo intestinal e por estimular o reflexo de motilidade, diminuindo assim a hidrólise de nutrientes e aumentando o trânsito do alimento no intestino. Pesquisas avaliaram o efeito de suplementação de  $\alpha$ -galactosidase no valor energético de farelo de soja em 30 e 40% na dieta de frangos e indicaram um aumento no conteúdo de energia metabolizável aparente em 8 e 11%, respectivamente (COUSINS, 1999).

### **2.5.3. Indústria de papel**

Na indústria de papel, a extração de lignina das fibras da madeira é um passo essencial no branqueamento da polpa. O pré-tratamento da polpa, sob condições alcalinas, hidrolisa a ligação covalente entre a hemicelulose e a lignina, facilitando a subsequente remoção dessa última. Entretanto, esse trabalho cria um sério problema de poluição ambiental. O uso alternativo de hemicelulases,  $\beta$ -mananase e  $\alpha$ -galactosidases, igualmente facilita a remoção da lignina no branqueamento da polpa, comparável ao pré-tratamento alcalino, e possibilita uma significativa redução na poluição ambiental (SAID e PIETRO, 2004).

## **2.6. VINHAÇA DE SOJA**

A vinhaça soja é o principal subproduto gerado pela fermentação alcoólica de melaço de soja. É o resíduo da destilação de produtos do processo de recuperação de etanol. O resíduo tem uma alta concentração de compostos orgânicos, essencialmente açúcares não redutores. Devido à quantidade alta de DBO e DQO, a vinhaça não pode ser tratada como um efluente comum (SIQUEIRA, 2006).

A fermentação do melaço de soja para produção de etanol é um processo inédito desenvolvido pela Divisão de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia da UFPR, e está sendo aplicado em uma companhia brasileira. O melaço é um subproduto da produção de farelo de soja e resulta da extração de açúcares do farelo de soja desengordurado. O melaço representa um meio nutritivo com alta concentração de açúcares, nitrogênio e outros macro e micronutrientes.

A vinhaça de soja contém uma quantidade considerável de açúcares residuais (oligômeros com ligações  $\alpha$ -1,6), de acordo com a TABELA 2.

TABELA 2 – COMPOSIÇÃO MÉDIA DO MELAÇO E VINHAÇA DE SOJA (SIQUEIRA, 2006; KARP, 2007)

Componente	Melaço (% base seca)	Vinhaça (% base seca)
Estaquiase	18,6	11,09
Rafinose	9,68	22,07
Sacarose	28,4	0
Glicose	0,243	0
Frutose	0,127	0
Galactose	0,254	1,84
Total de Carboidratos	57,3	35,0
Proteínas	9,44	13,3
Lipídios	21,2	27,8
Cinzas	6,36	9,24
Fibras	5,70	14,6

Atualmente, aproximadamente 260 m<sup>3</sup> por dia de vinhaça são gerados a partir de 10 m<sup>3</sup> de etanol por dia em uma indústria brasileira processadora de grãos de soja (SIQUEIRA, 2006).

A fermentação alcoólica do melaço de soja por *Saccharomyces cerevisiae* converte 50% do total de açúcares em etanol. Entre eles estão a sacarose, a glicose e a frutose. Os açúcares residuais são oligômeros com ligação  $\alpha$ -1,6, que podem ser hidrolisados pela enzima  $\alpha$ -galactosidase.

## 2.7. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

O planejamento experimental é o diferencial para planejar criteriosamente e chegar às condições otimizadas mais rapidamente, a um menor custo e com o suporte estatístico na discussão dos resultados. É uma ferramenta indispensável que nos fornece a segurança para tirar as conclusões sobre o trabalho (RODRIGUES e IEMMA, 2005).



### **2.7.1. Delineamento Plackett & Burman (PB)**

Consiste na metodologia de *Screening Design* para a seleção das variáveis. É utilizada para selecionar fatores que influenciam significativamente o processo, e não para otimizar o processo propriamente dito. É um delineamento essencialmente para *screening* e não deve ser tomado como o delineamento final (RODRIGUES e IEMMA, 2005).

### **2.7.2. Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR)**

O delineamento composto central rotacional (DCCR) é utilizado para a otimização das condições de um determinado processo. Permite elaborar um modelo preditivo das respostas em função das variáveis independentes (RODRIGUES E IEMMA, 2005).

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. SELEÇÃO DE CEPAS PARA A PRODUÇÃO DE $\alpha$ -GALACTOSIDASE

Foram testadas oito linhagens de *Lactobacillus* e uma linhagem de *Lactococcus* para a produção de  $\alpha$ -galactosidase a partir de vinhaça de soja: *Lactobacillus paracasei* LPB E1, *Lactobacillus pentosus* NRRL B-227, *Lactobacillus plantarum* NRRL B-4496, *Lactobacillus delbrueckii* FAT-0846, *Lactobacillus fermentum* LPB 7, *Lactobacillus agilis* LPB 56, *Lactobacillus casei rhamnosus* LPB H19, *Lactobacillus salivarius* NRRL B-1949 e *Lactococcus raffinolactis* DSM 20443. A designação LBP se refere às linhagens disponíveis na coleção de culturas do Departamento de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia (DEBB/UFPR). As demais linhagens foram adquiridas das coleções de cultura NRRL (Northern Regional Research Laboratory), FAT (Fundação André Tosello) e DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen).

As nove linhagens, estocadas em meio MRS (Man-Rogosa-Sharpe) com 25% de solução de glicerol a -80°C, foram reativadas em tubos contendo caldo MRS (lactobacilli) ou caldo TS (Trypticase soy) enriquecido com 0,3% de extrato de levedura (*Lactococcus*) e incubados em temperatura ótima (45 °C para *L. delbrueckii* e 30 °C para as demais linhagens). Após o crescimento dos micro-organismos (análise visual), este caldo foi transferido para o meio do inóculo (caldo MRS ou TS em pH 6,5) na proporção de 10% (v/v), os quais foram incubados durante 12 h (referência em estudos prévios) em temperatura ótima conforme descrito anteriormente, a 120 rpm. A seleção das linhagens foi conduzida em vinhaça de soja com 10% de sólidos solúveis (°Brix) correspondendo a 4,1% de açúcares totais, pH inicial 6,5, inoculado a 10% (v/v), em frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 175 mL de caldo (FIGURA 3) incubados em temperatura ótima de 30 ou 45 °C, a 120 rpm durante 96 h. Atividade enzimática extracelular foi determinada em 48, 72 e 96 h conforme item 3.8.2. A concentração de açúcares foi determinada para as amostras que apresentaram maiores atividades de acordo com o item 3.8.3. Estes ensaios foram realizados em duplicata.



FIGURA 3 – FERMENTAÇÃO DA VINHAÇA DE SOJA EM FRASCOS ERLLENMEYER INCUBADOS EM SHAKER PARA SELEÇÃO DE CEPAS

### 3.2. PREPARAÇÃO DO MEIO DE FERMENTAÇÃO À BASE DE VINHAÇA DE SOJA PARA A PRODUÇÃO DE $\alpha$ -GALACTOSIDASE

A vinhaça de soja foi preparada a partir da fermentação alcoólica do melaço de soja. O melaço de soja foi fornecido por uma indústria brasileira processadora de soja, situada na região de Curitiba, na concentração de 70°Brix (% sólidos solúveis, m/v), armazenado em temperatura ambiente. O melaço de soja foi diluído com água destilada a 30°Brix e foi fermentado com *Saccharomyces cerevisiae* (levedura prensada da marca Levasaf, 10 g/L), a 30°C, 150 rpm durante 24 h, utilizando o biorreator New Brunswick Scientific-Bioflo 110 (volume total de 14 L).

O caldo fermentado (FIGURA 4) foi centrifugado a 20.000 g por 20 minutos em uma centrífuga tubular (Carl Padberg-Z41) para remover células da levedura.



FIGURA 4 – AMOSTRA DO MELAÇO DE SOJA FERMENTADO COM *Saccharomyces cerevisiae* APÓS CENTRIFUGAÇÃO

O etanol foi separado do caldo através de evaporação à vácuo em roto-evaporador a 78°C (TE-210-Tecnal), resultando então na vinhaça. O esquema deste processo está representado na FIGURA 5. Esse procedimento foi realizado de acordo com os experimentos de Karp (2007) com adaptações.

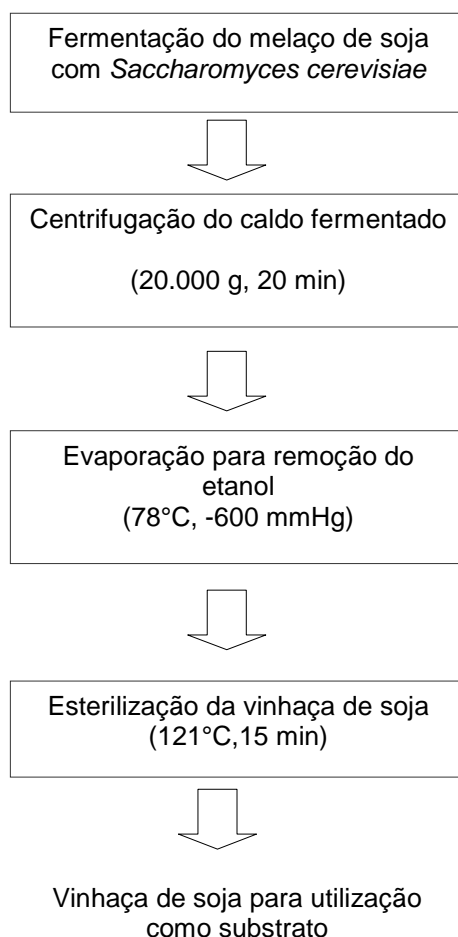


FIGURA 5 – ESQUEMA DO PREPARO DE VINHAÇA DE SOJA EM ESCALA LABORATORIAL

### 3.3. EFEITO DE DIFERENTES FONTES DE NITROGÊNIO E RELAÇÕES C:N NO CRESCIMENTO CELULAR E NA PRODUÇÃO DE $\alpha$ -GALACTOSIDASE NO INÓCULO

O preparo do inóculo foi testado em meio MRS e vinhaça de soja. As linhagens selecionadas foram reativadas em caldo MRS estéril. O meio à base de vinhaça foi preparado a 10°Brix e pH 6,5. A curva de crescimento celular foi determinada utilizando frascos Erlenmeyer de 250 mL incubados em shaker a 120

rpm, 30°C, durante 24 horas. A determinação de células viáveis foi realizada a cada 4 horas pela técnica de microgotas conforme descrito no item 3.8.5.

Com o objetivo de otimizar o crescimento celular no inóculo à base de vinhaça, foi avaliada a suplementação com cinco fontes de nitrogênio, incluindo fontes orgânicas (peptona proteose, extrato de levedura e ureia) e inorgânicas (nitrato de amônio e sulfato de amônio), em diferentes relações C:N (1:1, 3:1, 6:1, 9:1, 11:1 e 13:1). A concentração celular foi avaliada no meio do inóculo após 12 horas conforme item 3.8.5. Estes inóculos foram transferidos para o meio de fermentação (10 °Brix, 2% CaCO<sub>3</sub>, pH 6,5) na taxa de 10 % v/v e a atividade de  $\alpha$ -galactosidase foi testada em 72 h. Os ensaios foram realizados em duplicata.

### 3.4. OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE CULTURA E COMPOSIÇÃO DO MEIO PARA A PRODUÇÃO DE $\alpha$ -GALACTOSIDASE

#### 3.4.1. Seleção das condições de cultura e composição do meio que afetam a produção de $\alpha$ -galactosidase aplicando um delineamento Plackett-Burman

Com o objetivo de determinar quais variáveis afetam significativamente a produção de  $\alpha$ -galactosidase, um delineamento Plackett-Burman (PB) foi empregado. Sete variáveis (incluindo uma variável “dummy”) foram utilizadas em 8 ensaios. O software estatístico “Statistica 5.0” (Stasoft, Inc.) foi utilizado para a obtenção do planejamento experimental (TABELA 3) e análise dos resultados.

TABELA 3 – PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL APLICANDO UM DELINEAMENTO PLACKETT-BURMAN

Ensaio	Temp. (°C)	pH	Rotação (rpm)	Sólidos solúveis (°Brix)	Tamanho do inóculo (% v/v)	Extrato de levedura (C:N)	Variável Dummy
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	X <sub>4</sub>	X <sub>5</sub>	X <sub>6</sub>	X <sub>7</sub>
1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	1
2	-1	-1	+1	-1	+1	+1	-1
3	-1	+1	-1	+1	-1	+1	-1
4	-1	+1	+1	+1	+1	-1	1
5	+1	-1	-1	+1	+1	-1	-1
6	+1	-1	+1	+1	-1	+1	1
7	+1	+1	-1	-1	+1	+1	1
8	+1	+1	+1	-1	-1	-1	-1

Todas as seis variáveis (temperatura, pH inicial, velocidade de rotação, tamanho do inóculo, porcentagem de sólidos solúveis e relação C:N) foram estudadas em dois níveis (TABELA 4).

TABELA 4 – VALORES CODIFICADOS E REAIS REFERENTES ÀS CONDIÇÕES DE CULTURA E COMPOSIÇÃO DO MEIO UTILIZADOS NO DELINEAMENTO PLACKETT-BURMAN

		-1	+1
Temperatura (°C)	X <sub>1</sub>	25	35
pH	X <sub>2</sub>	6,0	7,0
Rotação (rpm)	X <sub>3</sub>	110	130
Sólidos solúveis (°Brix)	X <sub>4</sub>	10	20
Tamanho do inóculo (% v/v)	X <sub>5</sub>	10	20
Extrato de levedura (Relação C:N)	X <sub>6</sub>	3	6

Para estes ensaios, foi utilizado inóculo com as melhores condições obtidas nos experimentos descritos no item 3.3.

### 3.4.2. Otimização das condições de cultura e composição do meio que afetam a produção de $\alpha$ -galactosidase utilizando DCCR (Delineamento Composto Central Rotacional)

Um delineamento composto central (2<sup>3</sup>), com 3 repetições no ponto central e 6 pontos axiais, totalizando 17 ensaios, foi empregado para estudar o efeito da concentração de sólidos solúveis, concentração do inóculo e relação C:N na produção de  $\alpha$ -galactosidase, como mostrado na TABELA 5.

TABELA 5 – PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL APLICANDO O DELINEAMENTO COMPOSTO CENTRAL ROTACIONAL (2<sup>3</sup>)

Ensaio	Sólidos solúveis % (°Brix)	Tamanho do inóculo (% v/v)	Extrato de levedura (relação C:N)
1	-1	-1	-1
2	+1	-1	-1
3	-1	+1	-1
4	+1	+1	-1
5	-1	-1	+1
6	+1	-1	+1
7	-1	+1	+1
8	+1	+1	+1
9	-1,68	0	0
10	+1,68	0	0
11	0	-1,68	0
12	0	+1,68	0
13	0	0	-1,68
14	0	0	+1,68
15	0	0	0
16	0	0	0
17	0	0	0

A vinhaça foi concentrada no roto-evaporador (FIGURA 6) para alcançar as concentrações finais de 22, 25, 30, 35 e 38°Brix considerando a diluição após inoculação. As concentrações do inóculo estudadas foram 8, 15, 25, 35 e 42 % (v/v) (TABELA 6). É importante salientar que os valores definidos para a concentração do inóculo foram relativamente altos, baseados em trabalho desenvolvido por Karp (2007), em função da obtenção de resultados significativos de produção de ácido láctico com a mesma linhagem de micro-organismo e substrato semelhante.

TABELA 6 – VALORES UTILIZADOS NO DELINEAMENTO COMPOSTO CENTRAL PARA TESTE DE CONCENTRAÇÃO DE SÓLIDOS SOLÚVEIS, TAMANHO DO INÓCULO E CONCENTRAÇÃO DE EXTRATO DE LEVEDURA

VARIÁVEIS	NÍVEL				
	-1,68	-1	0	+1	+1,68
Sólidos solúveis (°Brix)	22	25	30	35	38
Inóculo (% v/v)	8	15	25	35	42
Relação C:N	2:1	6:1	9:1	12:1	14:1

O meio de fermentação foi suplementado com a fonte de nitrogênio ótima (extrato de levedura) conforme item 3.3, nas seguintes relações C:N 2:1, 6:1, 9:1, 12:1 e 14:1, determinadas através de balanço com base na composição físico-química do meio. O pH da vinhaça foi ajustado em 6,5 com KOH 5 N e 6 % (m/v) de  $\text{CaCO}_3$  foi adicionado de acordo com os resultados de Karp (2007) por ter ação tamponante e ser não tóxico. A esterilização foi conduzida a 121°C/15 min, 1 atm. O inóculo foi preparado em vinhaça com 15 °Brix suplementada com fonte de nitrogênio (extrato de levedura), relação C:N ótima 6,0 e tempo de incubação de 24 h.



FIGURA 6 – CONCENTRAÇÃO DA VINHAÇA DE SOJA EM ROTOEVAPORADOR

Ensaio de fermentação foram conduzidos em frascos Erlenmeyer de 250 mL adicionados de 175 mL do meio formulado, incubados a 30°C, durante 72 h e agitação a 120 rpm para homogeneização do meio e incorporação do oxigênio (FIGURA 7).



FIGURA 7 – FERMENTAÇÃO DA VINHAÇA DE SOJA EM FRASCOS ERLLENMEYER INCUBADOS EM SHAKER A 30°C, 120 rpm

### 3.5. PRODUÇÃO DE $\alpha$ -GALACTOSIDASE EM BIORREATOR SOB CONDIÇÕES OTIMIZADAS EM FRASCOS

O mesmo processo foi conduzido em um biorreator (New Brunswick Scientific – Bioflo 110) com volume total de 14 L adicionado de 10 L do meio de fermentação (FIGURA 8) objetivando a produção da enzima em maior escala. No biorreator foram controlados agitação, pH e temperatura. A fermentação foi conduzida sob condições otimizadas de porcentagem de sólidos solúveis (30%), concentração de inóculo (25% v/v) e relação C:N (9:1). O pH foi continuamente controlado em 6,5 pela adição de KOH 5 N, além da adição de 1 % (m/v) de  $\text{CaCO}_3$  no início da fermentação. Após incubação a 30°C, 150 rpm, durante 192 h, o sobrenadante, separado por centrifugação, foi utilizado para dosagem de enzima extracelular e a biomassa para o estudo da síntese da enzima intracelular.





FIGURA 8 – PRODUÇÃO DE  $\alpha$ -GALACTOSIDASE EM BIORREATOR (NEW BRUNSWICK SCIENTIFIC – BIOFLO 110)

### 3.6. PURIFICAÇÃO PARCIAL DA $\alpha$ -GALACTOSIDASE

A  $\alpha$ -galactosidase foi preliminarmente purificada de acordo com o fluxograma apresentado a seguir (FIGURA 9).

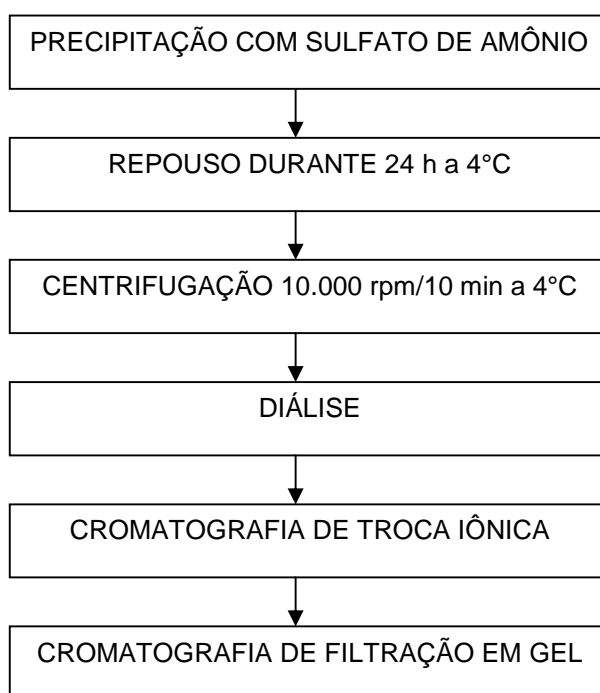


FIGURA 9 – FLUXOGRAMA DE PURIFICAÇÃO PARCIAL DA ENZIMA  $\alpha$ -GALACTOSIDASE

### 3.6.1. Precipitação com sulfato de amônio

O extrato bruto foi submetido a uma precipitação (*salting out*) pela adição cuidadosa de sulfato de amônio nas concentrações 20, 40, 60 e 80% de saturação, sob agitação lenta e constante com auxílio de agitador magnético, em banho de gelo (FIGURA 10). A quantidade de sulfato de amônio requerida para alcançar os graus de saturação citados anteriormente foi baseada na tabela de saturação (AMERSHAM BIOSCIENCES, 2004). Após repouso de 24 h a 4°C, a amostra foi centrifugada a 10.000 g, durante 20 min, em centrífuga (Sorvall® Legend™ MACH 1.6/R) a 4°C.



FIGURA 10 – PRECIPITAÇÃO DE PROTEÍNAS COM SULFATO DE AMÔNIO

### 3.6.2. Diálise

Após a precipitação, o precipitado foi ressuspendido em dois tampões, sendo o primeiro, acetato de sódio 100 mM, pH 5,0 e o segundo, acetato de amônio 50 mM. O primeiro tampão objetivou a preparação para a próxima etapa de purificação, enquanto o outro foi utilizado para o preparo da amostra para eletroforese. Em seguida, o precipitado ressuspendido nos respectivos tampões foi introduzido em membranas de celulose 25 mm x 16 mm (Sigma Aldrich) cujas extremidades foram fechadas resultando em formato de uma “bala” mergulhadas nas soluções (FIGURA 11). Foi mantido em repouso durante 24 h a 4°C, com renovação da solução.



FIGURA 11 – DIÁLISE DO PRECIPITADO RESSUSPENDIDO EM TAMPÃO NO INTERIOR DA MEMBRANA DE CELULOSE

### 3.6.3. Cromatografia de troca iônica

#### 3.6.3.1. Experimentos prévios para otimização da cromatografia de troca iônica em microtubos eppendorf

Primeiramente foram realizados testes em processo descontínuo para otimização dos parâmetros da cromatografia de troca iônica. Utilizou-se microtubos eppendorf de 2,0 mL para testes de duas resinas para purificação da  $\alpha$ -galactosidase, uma catiônica (SP - Sepharose Fast Flow – GE HEALTHCARE) e outra aniônica (DEAE – Sepharose CL-6B – AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH AB) (FIGURA 12).

As seguintes etapas foram realizadas:

- 1) As resinas foram equilibradas previamente com solução Glicina-HCl 25 mM pH 3,0 e 4,0 para a resina catiônica e com solução Tris-HCl 50 mM pH 6,0 e 7,0 para a resina aniônica. Foram utilizados diferentes valores de pH para verificar as condições de condicionamento da troca iônica.
- 2) Em seguida, as amostras foram submetidas à centrifugação a 10000 g por 10 minutos;
- 3) Foram testadas diluições das amostras nas proporções 1:4, 1:5 e 1:6. A resina foi carregada com as amostras diluídas e agitadas lentamente por 20 minutos;
- 4) A resina foi submetida à centrifugação 10.000 g por 10 minutos. O sobrenadante foi transferido para outro frasco nomeado como *not bound* (fração que não se ligou à resina) para análise da atividade enzimática;

- 5) Foi adicionado 1 mL de solução de glicina e Tris na resina catiônica e aniônica, respectivamente, e agitado lentamente durante 20 minutos;
- 6) Novamente foi realizada uma centrifugação a 10.000 g por 10 min. O sobrenadante foi transferido para outro frasco nomeado como *wash* para análise da atividade enzimática;
- 7) Para o procedimento de eluição, utilizou-se 1 mL de solução de NaCl 1M com agitação lenta por 20 min. Em seguida, o conteúdo foi centrifugado, obtendo o sobrenadante nomeado como eluído (E) e submetido à análise de atividade enzimática;
- 8) A regeneração das resinas para remoção dos contaminantes, foi realizada com sucessivas lavagens com NaCl 1M, ácido acético, NaOH e estocado com etanol em geladeira para evitar a degradação microbiana.

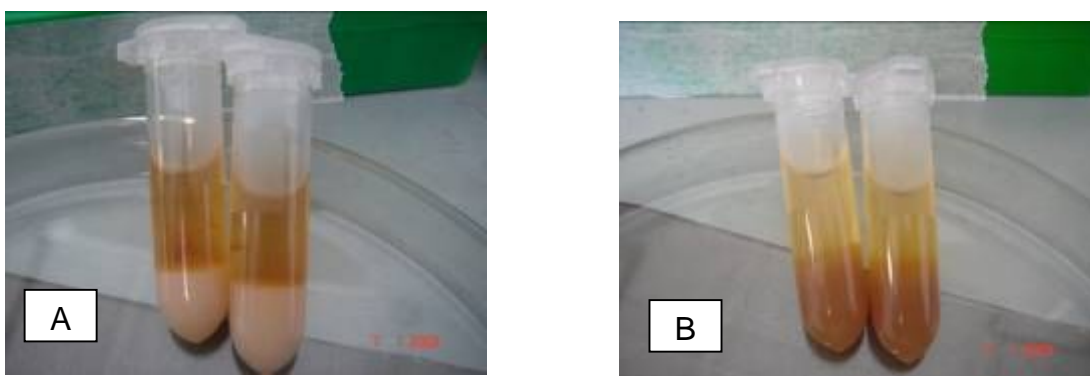


FIGURA 12 – CROMATOGRAFIA IÔNICA EM TUBO EPPENDORF. (A) EXTRATO BRUTO ADSORVIDO NA RESINA CATIÔNICA; (B) EXTRATO BRUTO ADSORVIDO NA RESINA ANIÔNICA

### 3.6.3.2. Cromatografia de troca iônica em coluna

O processo desenvolvido em microtubos eppendorf foi transferido para a coluna de cromatografia sob condições otimizadas. O extrato bruto foi submetido à cromatografia de troca iônica em uma coluna aniônica (20,0 x 3,0 cm) de DEAE–Sephacrose, previamente equilibrada com solução Tris-HCl 20 mM pH 7,0 (FIGURA 13).

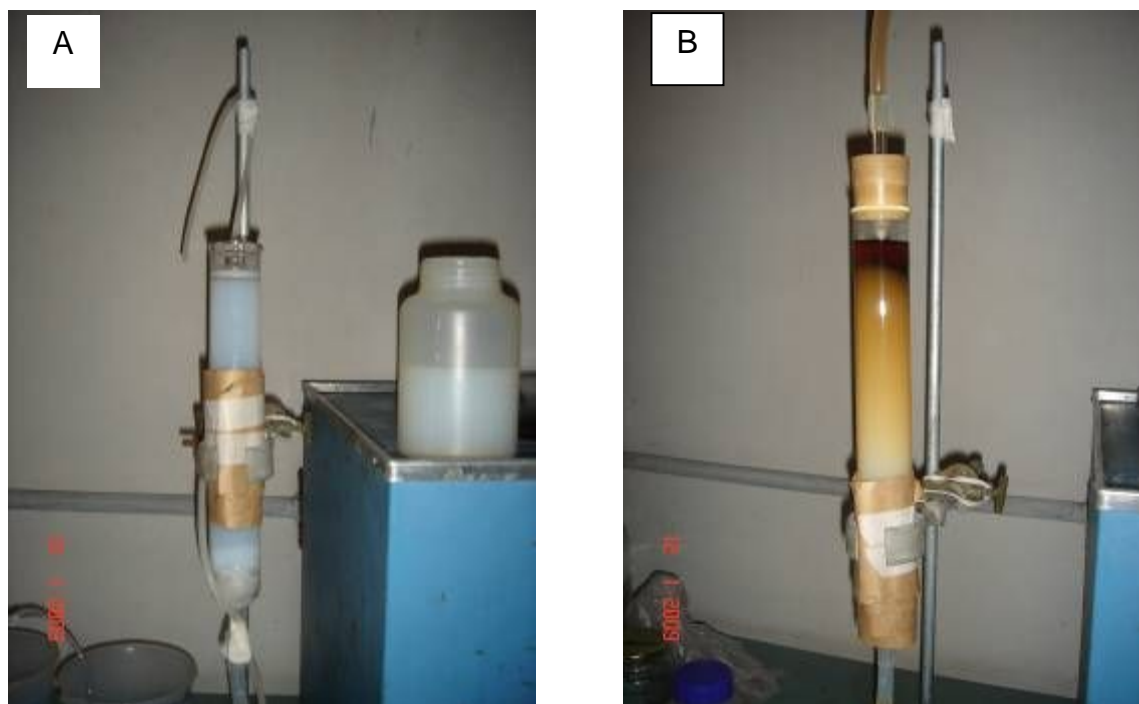


FIGURA 13 – (A) CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA EM COLUNA COM RESINA DEAE-SEPHAROSE; (B) COLUNA DEAE-SEPHAROSE COM AMOSTRA

As proteínas foram eluídas por um gradiente salino (FIGURA 14) crescente formado por 250 mL de solução tampão acetato de sódio 100 mM e 250 mL da mesma solução tampão contendo NaCl 1 M, a 4°C, com fluxo de 40 mL/h. Foram coletadas frações de 9,0 mL (FIGURA 15).



FIGURA 14 – FORMADOR DE GRADIENTE E AGITADOR



FIGURA 15 – FRAÇÕES ELUÍDAS DA CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA (DEAE-SEPHAROSE) NO COLETOR

As frações eluídas apresentando os maiores valores de atividade de  $\alpha$ -galactosidase foram reunidas, dialisadas conforme descrito no item 3.6.2 (FIGURA 16) e liofilizadas.



FIGURA 16 – DIÁLISE DAS FRAÇÕES ELUÍDAS DA CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA (DEAE-SEPHAROSE)

#### 3.6.4. Cromatografia de filtração em gel

A amostra liofilizada proveniente da cromatografia de troca iônica foi ressuspensa em tampão acetato de sódio 100 mM (200  $\mu$ L), pH 5,0, submetida à cromatografia de filtração em gel em uma coluna (24,0 x 1,0 cm) de agarose Superose 6 FPLC Pharmacia Biotech (FIGURA 17) e equilibrada com o mesmo tampão. As proteínas também foram eluídas com o tampão acetato de sódio, com

fluxo contínuo 0,5 mL/min. Foram coletadas frações de 1,0 mL. As frações com atividade de  $\alpha$ -galactosidase foram reunidas e liofilizadas.



FIGURA 17 – CROMATOGRAFIA DE FILTRAÇÃO EM GEL UTILIZANDO COLUNA DE AGAROSE SUPEROSE 6

### 3.6.5. Eletroforese

A eletroforese em gel de poliacrilamida 12,5%, contendo SDS e  $\beta$ -mercaptoetanol foi realizada conforme descrito por LAEMMLI (1970), com modificações.

O sistema utilizado apresenta cuba vertical, utilizando placas de vidro medindo 8 x 10 cm previamente lavadas, secas e limpas com álcool 70% (FIGURA 18). Em seguida, foram montadas em suporte cuidadosamente para a perfeita vedação.

Os gel separador foi preparado a partir de uma mistura de solução de acrilamida 40% (m/v) (5% m/v de N, N'- metileno bisacrilamida) (1,5 mL), tampão Tris/HCl 1,5 M, pH 8,8 (1,25 mL), dodecil sulfato de sódio (SDS) 10% (m/v) (0,050 mL), persulfato de amônio 10% (m/v) (0,025 mL), N,N,N,N-tetrametil-etilenodiamino de sódio (TEMED) (0,0025 mL) e água destilada (2,175 mL). Em seguida, a mistura foi colocada nos moldes de vidro com uma camada de água destilada sobre esta solução para evitar a formação de menisco côncavo, efeito provocado pela tensão superficial do gel.



O gel de empilhamento foi preparado a partir da mistura de solução de acrilamida 40% (m/v) (5% m/v de N, N'- metileno bisacrilamida) (0,2435 mL), tampão Tris/HCl 0,5 M, pH 6,8 (0,65 mL), dodecil sulfato de sódio (SDS) 10% (m/v) (0,025 mL), persulfato de amônio 10% (m/v) (0,0125 mL), N,N,N,N-tetrametil-etilenodiamino de sódio (TEMED) (0,005 mL) e água destilada (1,58 mL).

O gel de empilhamento foi colocado sobre o gel de separação depois de sua polimerização, formando uma camada de aproximadamente 1,0 cm de altura. Um molde plástico foi introduzido (pente) nesta camada para a formação dos poços de aplicação.

Após a preparação dos géis, as placas foram fixadas na cuba vertical.

As corridas eletroforéticas foram realizadas a temperatura ambiente, a 80 V, em placas do sistema. O tampão de corrida pH 8,3 foi preparado a partir de Tris (3,0 g), glicina (14,4 g) e SDS (1,0 g) para 1 L de água destilada. As amostras submetidas à eletroforese foram adicionadas ao tampão de amostra (Tris/HCl, 0,5 M, pH 6,8, glicerol 88%, SDS 10% (m/v),  $\beta$ -mercaptoetanol, azul de bromofenol 0,05% (m/v) e água destilada), fervidas durante 5 min e aplicadas no gel.

Os marcadores de massa molecular utilizados foram os seguintes:  $\beta$ -galactosidase (116 kDa), albumina sérica bovina (BSA) (66,2 kDa), ovoalbumina (45 kDa), lactato desidrogenase (35 kDa), REase Bsp 98I (25 kDa),  $\beta$ -lactoglobulina (18,4 kDa), lisozima (14,4 kDa). As massas moleculares das frações proteicas foram estimadas através do Software "Image J".



FIGURA 18 – TÉCNICA DE ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA 12,5% EM SISTEMA VERTICAL



### 3.6.5.1. Coloração dos géis de eletroforese

Após a corrida eletroforética, os géis foram retirados dos moldes de vidro e as proteínas presentes nos géis foram reveladas com corante Coomassie Blue R 250, na quantidade suficiente para cobrir todo o gel e, agitado lentamente até a visualização das bandas proteicas. Posteriormente, os géis foram descorados com metanol, ácido acético e água destilada 200:50:250 (v/v) até a completa evidência das bandas.

## 3.7. CARACTERIZAÇÃO ENZIMÁTICA

Os procedimentos adotados para realização da caracterização enzimática foram adaptados de experimentos de GOTE *et al.* (2006) e SPIER (2008).

### 3.7.1. Efeito do pH na atividade da $\alpha$ -galactosidase

Para a determinação do pH ótimo de atividade da  $\alpha$ -galactosidase, a mistura das soluções de reação e as condições de ensaio foram as mesmas descritas no item 3.8.2, exceto que, o ensaio foi realizado em diferentes valores de pH: 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 3,5; 4,0; 4,5; 5,0; 5,5; 6,0; 6,5; 7,0; 7,5; 8,0; 8,5; 9,0; 9,5 e 10,0 utilizando as seguintes soluções para o ajuste de pH: pH 1,0 a 3,0 – glicina 0,1 M ajustada com ácido clorídrico 4 N, pH 3,5 a 5,5 – acetato de sódio 0,1 M ajustada com ácido acético 1 N, pH 6,0 a 8,5 – Tris 0,1 M ajustada com ácido clorídrico 4 N, pH 9,0 a 10,0 – glicina 0,1 M ajustada com hidróxido de sódio 4 N.

### 3.7.2. Efeito do pH na estabilidade da $\alpha$ -galactosidase

O efeito do pH na estabilidade da enzima foi testado mantendo a enzima em diferentes valores de pH: 3,5; 4,0; 4,5; 5,0; 5,5; 6,0 e 6,5 (preparada conforme item 3.7.1) a 4°C, durante 24, 48 e 72 h, sendo que estas soluções foram adicionadas no caldo fermentado. Este teste foi realizado para verificar as condições de estabilidade da  $\alpha$ -galactosidase durante o processo de purificação. A atividade enzimática foi conduzida sob as mesmas condições de ensaio descritas no item 3.8.2.

### **3.7.3. Efeito da temperatura na atividade da $\alpha$ -galactosidase**

Para a determinação da temperatura ótima de atividade da  $\alpha$ -galactosidase, a mistura de reação e as condições de ensaio foram as mesmas descritas no item 3.8.2, sendo que, a reação enzimática foi conduzida nos seguintes intervalos de temperatura: 30, 35, 40, 45, 50, 55 e 60°C.

### **3.7.4. Análise de termoestabilidade**

A estabilidade térmica da  $\alpha$ -galactosidase foi testada em várias temperaturas. Alíquotas do extrato enzimático foram pré-incubados nas temperaturas: 20, 30, 40 e 50°C durante 60 min. A cada 10 min de pré-incubação, reações enzimáticas para determinação da atividade foram conduzidas conforme descrito no item 3.8.2.

### **3.7.5. Efeito do congelamento e refrigeração na estabilidade da $\alpha$ -galactosidase**

O extrato enzimático bruto foi submetido ao congelamento em freezer a -20°C e sob refrigeração a 5°C para avaliar a estabilidade da  $\alpha$ -galactosidase nestas condições de armazenamento. A atividade residual foi analisada em: 15, 30, 45 e 60 dias.

### **3.7.6. Efeito de íons metálicos como ativadores ou inibidores na atividade da $\alpha$ -galactosidase**

O efeito de íons na atividade enzimática foi analisado adicionando-se cada um dos seguintes compostos de modo a obter a concentração de 1,0 mM no meio de reação: sulfato de prata, sulfato de cálcio, sulfato de cobre pentahidratado, sulfato de magnésio heptahidratado, sulfato de manganês hidratado, sulfato de zinco heptahidratado, sulfato de ferro, sulfato de mercúrio, ácido etilenodiaminotetracético (EDTA). O ensaio da atividade enzimática foi conduzido conforme descrito no item 3.8.2.

### 3.7.7. Determinação das constantes de Michaelis-Menten ( $K_M$ ) e da velocidade máxima ( $V_{max}$ )

Para obtenção dos valores de  $K_M$  e  $V_{max}$ , os ensaios de atividade enzimática foram realizados utilizando-se concentrações crescentes do substrato pNPG. O ensaio enzimático foi conduzido conforme descrito no item 3.8.2, variando a concentração de pNPG: 0,25; 0,5; 0,75; 1,0; 1,25; 1,5; 1,75; 2,0; 2,25; 2,5 e 3,0 mM.

O efeito da concentração do substrato pNPG na velocidade de reação catalisada pela  $\alpha$ -galactosidase foi obtido pela curva de Michaelis-Menten de acordo com a equação ( $V = V_{max} [S]/(K_M + [S])$ ).

A constante cinética  $K_M$  indica a “adequacidade” relativa de diferentes substratos para uma determinada enzima. Ou seja, o substrato que apresenta um menor valor de  $K_M$  possui uma maior afinidade aparente pela enzima (SEGEL, 1979).

A grandeza  $V_{max}$  indica a velocidade máxima de formação do produto pela enzima. Os parâmetros cinéticos  $K_m$  e  $V_{max}$  foram estimados de acordo com a equação de Lineweaver-Burk, ( $1/V_0 = (K_M/V_{max})(1/[S]) + 1/V_{max}$ ) (LEHNINGER, 2007).

### 3.8. MÉTODOS ANALÍTICOS

#### 3.8.1. Determinação do teor de sólidos solúveis (°Brix) e rompimento de células

O teor de sólidos solúveis (°Brix) foi medido com refratômetro portátil para açúcares (Instrutherm, modelo RT-30 ATC).

Amostras foram centrifugadas a 10.000 g durante 10 min e a cultura sobrenadante foi utilizada para determinação da atividade extracelular de  $\alpha$ -galactosidase conforme item 3.8.2. Para a determinação da fração de  $\alpha$ -galactosidase intracelular, o precipitado foi lavado com tampão fosfato de potássio pH 7,0, centrifugado, e então ressuspenso no mesmo tampão (YOON e HWANG, 2008).

O rompimento de células foi realizado com sonicador da marca Bandelin, Sonopuls HD2070 (FIGURA 19). O processo foi conduzido em 8 ciclos de 30 segundos, 5 vezes, com potência de 40%, em banho de gelo. Os debris celulares foram removidos por centrifugação a 10.000 g por 10 min a 4°C. O sobrenadante foi utilizado como extrato enzimático bruto.



FIGURA 19 – SONICADOR (BANDELIN, SONOPULS HD2070) UTILIZADO PARA O ROMPIMENTO DE CÉLULAS

### 3.8.2. Determinação da atividade enzimática

A atividade da  $\alpha$ -galactosidase foi determinada usando substrato sintético, p-nitrofenil- $\alpha$ -D-galactopiranosídeo (pNPG, Fluka-Sigma-Aldrich), método adaptado por Oliveira *et al.* (2005) originalmente proposto por Garro *et al.* (1996). O sistema do ensaio continha 650  $\mu$ L de tampão acetato de sódio 100 mM, pH 5,0, 100  $\mu$ L do sobrenadante do meio fermentado e 250  $\mu$ L de p-nitrofenil- $\alpha$ -D-galactopiranosídeo 2 mM. A reação foi conduzida durante 15 min a 37°C e interrompida pela adição de carbonato de sódio 0,5 M. A quantidade de p-nitrofenol (pNP) liberada foi medida através da absorbância em espectrofotômetro a 410 nm (Visível-UV-1601 PC, Shimadzu). O branco do substrato foi preparado com tampão acetato de sódio e pNPG, enquanto que o branco da enzima foi preparado com tampão e amostra. Para calcular a atividade enzimática, foi elaborada uma curva de calibração na faixa de 0 a 0,20  $\mu$ mol de p-nitrofenol (pNP). Uma unidade (U) de atividade de  $\alpha$ -galactosidase foi definida como a quantidade de enzima que libera 1  $\mu$ mol de p-nitrofenol por minuto sob condições de ensaio padrão. O cálculo para a determinação da atividade da  $\alpha$ -galactosidase encontra-se no Apêndice 1.

### 3.8.3. Quantificação de açúcares e ácido lático

Açúcares e ácido lático foram quantificados por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC - marca Shimadzu Liquid Chromatograph), usando coluna Aminex HPX-87, fase móvel H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Merck, P.A., 95-97%) 5 mM, 0,6 mL/min a 60°C. As amostras foram diluídas com água ultrapura acidificado com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, centrifugadas a 10.000 g e filtradas com membrana PVDF 0,22  $\mu$ m, diâmetro de 13 mm (Millipore). A concentração de açúcares foi calculada pela soma das concentrações dos açúcares individuais. Os padrões utilizados para análise em HPLC foram: Estaquiiose tetrahidratado, 98,5% (Acros Organics); D(+)-rafinose pentahidratado, 99+% (Acros Organics); D(+)-glicose, ACS anidro, (Acros Organics); D(+)-frutose P.A. (Vetec); D(+)-galactose P.A. (Vetec) e ácido L-lático 85,0% P.A. (Synth).

#### **3.8.4. Determinação da concentração de proteína no extrato enzimático**

Os teores proteicos nas preparações enzimáticas da  $\alpha$ -galactosidase foram determinados conforme descrito por BRADFORD (1976). A mistura de reação contendo 100  $\mu$ L de amostra e 1000  $\mu$ L do reagente de Bradford foi deixada em repouso por 5 min a temperatura ambiente. A absorbância das amostras foi determinada espectrofotometricamente a 595 nm e a concentração de proteínas foi obtida por uma curva padrão com 0 – 10  $\mu$ g de albumina sérica bovina (BSA). O reagente de Bradford concentrado 5 vezes foi preparado misturando-se 50 mg de *Coomassie Brilliant Blue G 250* em 25 mL de etanol P.A. e 50 mL de ácido fosfórico 85% (v/v). Após solubilização, o volume foi completado para 500 mL e agitado por 30 min, filtrando-se em papel Whatman n°1. Este método baseia-se no desenvolvimento da cor em função da ligação da proteína com o pigmento *Coomassie Brilliant Blue G 250*.

#### **3.8.5. Determinação de células viáveis**

Nesse método a determinação do número de células viáveis (UFC/mL) foi realizada diluindo-se 1 mL do caldo fermentado em 9 mL de solução salina 0,9% e semeando-se 0,03 mL (30  $\mu$ L) de diferentes diluições em placas de Petri com meio de cultura sólido (MRS), na forma de microgotas. Essas microgotas são formadas pela saída da amostra da ponteira da pipeta escolhida. As placas foram incubadas em temperatura adequada até o crescimento visível das colônias. Para o cálculo dos resultados foi considerado o número total de colônias desenvolvidas, volume e respectivo fator de diluição (HOBEN & SOMASEGARAN, 1982).

#### **3.8.6. Determinação de biomassa por peso seco**

O crescimento microbiano também foi acompanhado pelo peso seco da biomassa. Foram utilizados microtubos eppendorf livres de umidade e previamente pesados em balança analítica. Em cada tubo foram adicionados 1 mL de cada amostra e foram centrifugados a 10.000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi reservado para análises posteriores e os sedimentos restantes foram lavados com água destilada e novamente centrifugados na mesma rotação. Foram realizadas

sucessivas pesagens até o momento em que não se observou mais variação do peso. O peso total é subtraído do peso inicial do tubo e da porcentagem de carbonato de cálcio adicionado ao caldo, dando como resultado o valor da massa celular e calculada a concentração em g/L.

#### **3.8.7. Determinação da densidade ótica (DO) do extrato enzimático**

A densidade ótica foi realizada para a determinação do perfil de proteínas de extrato enzimático. Utilizou-se espectrofotômetro para leitura da absorbância no comprimento de onda de 280 nm.

#### **3.8.8. Identificação do micro-organismo**

Para a identificação do micro-organismo, foi utilizada a técnica de coloração de Gram. O esfregaço foi coberto com violeta de genciana por aproximadamente 15 s. Foi adicionada igual quantidade de água sobre a lâmina coberta com violeta de genciana e deixado agir por mais 45 s. Em seguida, lavou-se com água corrente. A lâmina foi coberta com lugol diluído (1/20) por aproximadamente 1 min, lavando-se então com água corrente. Adicionou-se álcool etílico (99,5° GL) sobre a lâmina, descorando-a, até que não desprendesse mais corante. Lavou-se então com água corrente. A lâmina foi coberta com safranina por aproximadamente 30 s, lavada com água corrente e seca. Procedeu-se então a observação microscópica.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. SELEÇÃO DE CEPAS PARA A PRODUÇÃO DE $\alpha$ -GALACTOSIDASE

A TABELA 7 mostra os resultados do teste de seleção de micro-organismos. A análise de variância no nível de  $p < 0,05$  demonstrou que a resposta de atividade enzimática apresentada pelo *L. agilis* LPB 56 foi significativamente maior (0,545 U/mL em 72 h) que as outras médias, por isso esta cepa foi selecionada para os estudos subsequentes. Não existe relato na literatura sobre a produção de  $\alpha$ -galactosidase por *L. agilis*.

A linhagem de *L. agilis* apresentou o melhor desempenho na vinhaça de soja, com uma redução de 90% na concentração de açúcares totais em 72 h. As duas outras linhagens, *L. paracasei* LPB E1 (0,205 U/mL em 72 h) e *L. fermentum* LPB 7 (0,218 U/mL em 72 h), reduziram em 65% e 62% a concentração de açúcares, respectivamente.

TABELA 7 – ATIVIDADE EXTRACELULAR DA  $\alpha$ -GALACTOSIDASE POR NOVE DIFERENTES CEPAS DE BACTÉRIAS LÁTICAS. VALORES EM PARÊNTESES REPRESENTAM AS MÉDIAS DOS DESVIOS PADRÃO

CEPAS	ATIVIDADE $\alpha$ -gal (U/mL)		
	48h	72h	96h
<i>L. paracasei</i> LPB E1	0,156 (0,008)	0,205 (0,006)	0,209 (0,009)
<i>L. pentosus</i> NRRL B-227	0,081 (0,004)	0,198 (0,003)	0,145 (0,006)
<i>L. plantarum</i> NRRL B-4496	0,063 (0,003)	0,165 (0,007)	0,201 (0,01)
<i>L. delbrueckii</i> FAT 0846	0,019 (0,0007)	0,175 (0,002)	0,186 (0,008)
<i>L. fermentum</i> LPB 7	0,094 (0,006)	0,218 (0,0075)	0,150 (0,008)
<i>L. agilis</i> LPB 56	<b>0,393</b> (0,03)	<b>0,545</b> (0,025)	<b>0,498</b> (0,03)
<i>L. casei rhamnosus</i> LPB H19	0,134 (0,008)	0,106 (0,009)	0,109 (0,004)
<i>L. salivarius</i> NRRL B-1949	0,000 (0)	0,003 (0,0001)	0,090 (0,004)
<i>L. raffinolactis</i> DSM 20443	0,054 (0,004)	0,098 (0,003)	0,074 (0,003)

A espécie *L. agilis* faz parte do Grupo II do gênero *Lactobacillus*, que formam os *Lactobacillus* homofermentativos facultativos que fermentam as hexoses, pela via Embden-Meyerhof-Parnas, produzindo quase exclusivamente lactato (ROISSART e LUQUET, 1994).

A FIGURA 20 apresenta a imagem obtida de uma lâmina contendo células de *L. agilis* coradas pelo método de Gram. O *L. agilis* apresentou morfologia de bacilo,



Gram positivo, em arranjos variados (isolados, alinhados lado a lado e formando cadeias de estreptobacilos).



FIGURA 20 – VISUALIZAÇÃO DO *L. agilis* EM MICROSCÓPIO ÓPTICO (AUMENTO DE 1000x)

## 4.2. OTIMIZAÇÃO DO PREPARO DO INÓCULO

### 4.2.1. Cinética do crescimento celular em MRS e vinhaça de soja

Caldo MRS e vinhaça de soja foram comparados como meio para a produção celular, com o objetivo de substituir o meio sintético para o preparo de inóculo. A cinética do crescimento celular para a cepa *L. agilis* LPB 56 está mostrada na FIGURA 21 para ambos os meios.

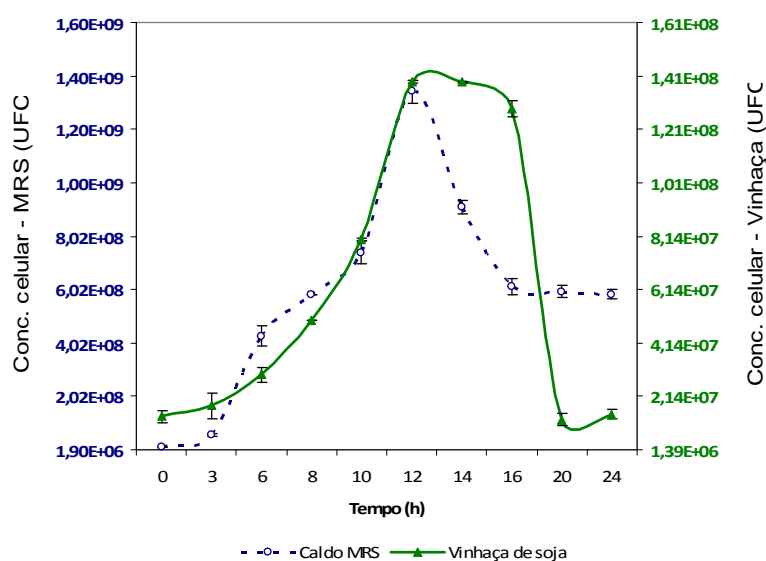


FIGURA 21 – CRESCIMENTO CELULAR DA CEPA *L. agilis* LPB 56 (UFC/mL)

O crescimento celular na vinhaça de soja apresentou resultado satisfatório, da ordem de  $10^8$  UFC/mL. Já o número de células viáveis para o meio MRS atingiu  $10^9$  UFC/mL. A fase estacionária foi aproximadamente 4 horas mais longa para a vinhaça. A atividade enzimática extracelular apresentada em 72 h no meio de fermentação foi 8 % maior no meio inoculado com 10 % (v/v) na vinhaça (média de 0,586 U/mL) quando comparada ao inóculo produzido em meio MRS. A atividade intracelular foi determinada após o rompimento de células e apresentou o valor de 1,52 U/mL. Então, concluiu-se que a cepa selecionada produziu  $\alpha$ -galactosidase intra e extracelular. A utilização de vinhaça como meio para o inóculo, além de reduzir os custos de fermentação, propiciou o início da adaptação da cepa ao meio de fermentação. Subsequentemente, a relação C:N foi otimizada com o objetivo de melhorar o crescimento celular na vinhaça.

#### **4.2.2. Suplementação do meio à base de vinhaça com diferentes fontes de nitrogênio e relações C:N**

Os resultados apresentados na TABELA 8 demonstraram que, entre fontes de nitrogênio inorgânicas e orgânicas, o meio enriquecido com extrato de levedura na relação C:N 6:1 forneceu a melhor produção celular ( $5,6 \times 10^8$  UFC/mL) para o inóculo. A cinética do crescimento celular foi avaliada com a adição de extrato de levedura. Resultados na FIGURA 22 confirmaram que a concentração máxima de células viáveis (em torno de  $5 \times 10^8$  UFC/mL) foi obtida com a relação C:N 6:1, em aproximadamente 12 h. A segunda maior produção celular ( $3,8 \times 10^8$  UFC/mL) foi obtida na relação C:N 3:1 também com extrato de levedura, porém isto representa maior adição de fonte de nitrogênio. Não houve diferença significativa entre as proporções 9:1 e 11:1 (em torno de  $10^7$  UFC/mL). A relação C:N 1,0 resultou na concentração de células viáveis em torno de  $10^6$  UFC/mL (dados não mostrados na FIGURA 22).

TABELA 8 – PRODUÇÃO CELULAR ( $\times 10^8$  UFC/mL) NA VINHAÇA EM 12 h PARA DIFERENTES FONTES DE NITROGÊNIO E RELAÇÕES C:N.

FONTE DE NITROGÊNIO	RELAÇÃO C:N					
	1	3	6	9	11	13
Sulfato de amônio	0,025	1,6	3,5	1,3	1,0	0,20
Nitrato de amônio	0,012	1,2	2,8	1,1	1,2	0,16
Extrato de levedura	0,037	3,8	<b>5,6</b>	0,96	1,3	0,17
Peptona proteose	0,0088	0,74	2,2	0,92	1,3	0,078
Ureia	0,012	0,62	1,2	0,89	0,96	0,085

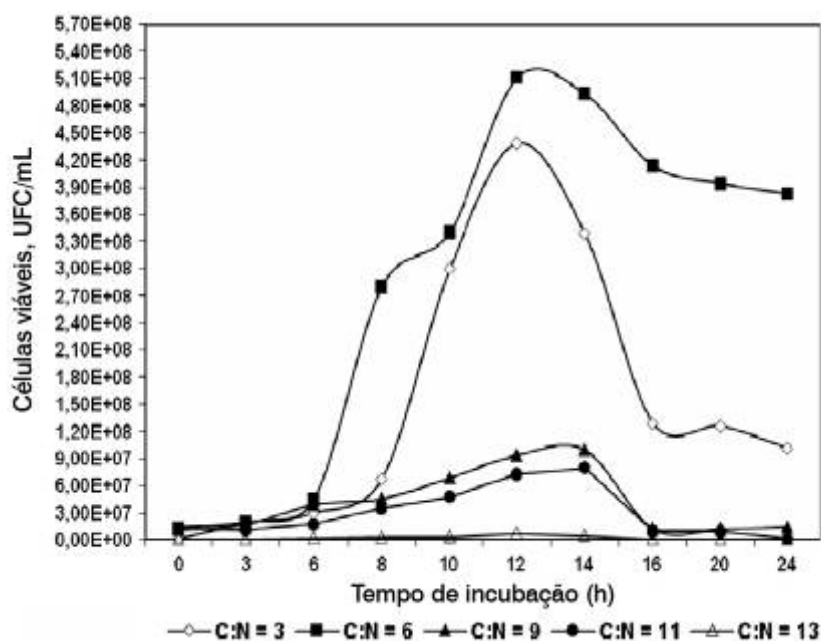


FIGURA 22 – CINÉTICA DE CRESCIMENTO DO *L. agilis* LPB 56 NO MEIO DE CULTIVO COM BASE EM VINHAÇA SUPLEMENTADO COM EXTRATO DE LEVEDURA EM DIFERENTES RELAÇÕES C:N.

De acordo com o teste de Tukey, a atividade da  $\alpha$ -galactosidase (1,60 U/mL extracelular e 4,33 U/mL total) apresentada pela cepa *L. agilis* LPB 56 quando utilizado extrato de levedura e relação C:N 6:1 foi significativamente maior do que as outras médias (FIGURA 23). A mesma situação foi relatada por Gote *et al.* (2004<sup>a</sup>), que reportou atividade da  $\alpha$ -galactosidase de 1,15 U/mL quando adicionado 0,5 % de extrato de levedura como fonte de nitrogênio no substrato farelo de soja.

A segunda melhor fonte de nitrogênio foi apresentada pelo sulfato de amônio na mesma relação C:N 6:1 (3,55 U/mL total).

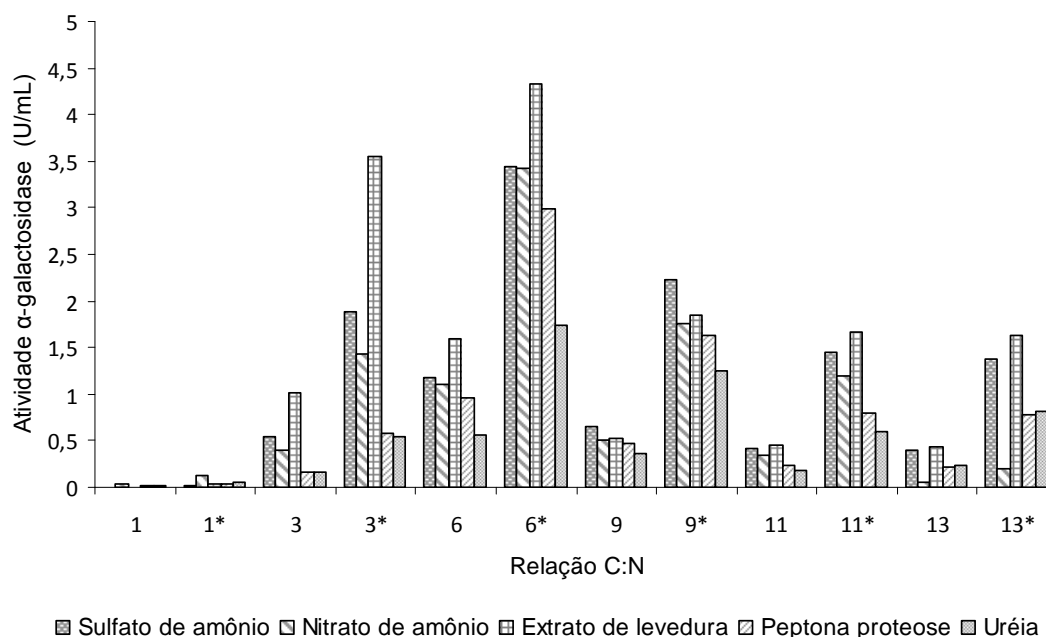


FIGURA 23 – ATIVIDADE DA  $\alpha$ -GALACTOSIDASE NO MEIO DE FERMENTAÇÃO APÓS 72 h COM DIFERENTES FONTES DE NITROGÊNIO E RELAÇÕES C:N NO INÓCULO. \* REFERE-SE À ATIVIDADE TOTAL (INTRACELULAR + EXTRACELULAR)

### 4.3. OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE CULTURA E COMPOSIÇÃO DO MEIO PARA PRODUÇÃO DE $\alpha$ -GALACTOSIDASE

#### 4.3.1. Seleção das condições de cultura e composição do meio que afetam a produção de $\alpha$ -galactosidase utilizando o Delineamento Plackett-Burman (PB)

Os valores de temperatura (25 e 35°C) e pH (6,0 e 7,0) foram escolhidos de acordo com valores reportados na literatura (ROISSART e LUQUET, 1994). Os valores de velocidade de agitação (110 e 130 rpm), concentração de sólidos solúveis 10 e 20°Brix) e concentração do inóculo (10 e 20%) foram definidos com base em parâmetros utilizados por Karp (2007). As relações C:N (3:1 e 6:1) foram definidas de acordo com o teste de preparo do inóculo (item 4.2.2.).

Experimentos preliminares revelaram que a suplementação de sais minerais ( $K_2HPO_4$ ,  $KH_2PO_4$ ,  $MnSO_4 \cdot H_2O$ ,  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ ,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ,  $CaCl_2$  e  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ ) no meio de fermentação não afetou significativamente a produção de  $\alpha$ -galactosidase (dados não mostrados). Possivelmente pela existência destes minerais na composição do melaço de soja: Cálcio (11,79 mg/100g); Ferro (0,80 mg/100g); Fósforo (152,77 mg/100g); Magnésio (1,05 mg/100g); Manganês (0,17

mg/100g); Potássio (1730,50 mg/100g); Sódio (75,19 mg/100g) e Zinco (1,48 mg/100g).

Atividades de  $\alpha$ -galactosidase obtidas para os diferentes fatores e níveis estão apresentados na TABELA 9.

TABELA 9 – ATIVIDADES DE  $\alpha$ -GALACTOSIDASE PARA AS DIFERENTES CONDIÇÕES DE CULTURA E COMPOSIÇÕES DO MEIO APÓS 72 h DE FERMENTAÇÃO

Ensaio	Temp. (°C)	pH	Rotação (rpm)	Sólidos solúveis (°Brix)	Tamanho do inóculo (% v/v)	Extrato levedura (C:N)	Variável Dummy	Atividade $\alpha$ -gal total (U/mL)
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	X <sub>4</sub>	X <sub>5</sub>	X <sub>6</sub>	X <sub>7</sub>	
1	25	6	110	10	10	3	1	2,53
2	25	6	130	10	20	6	-1	6,23
3	25	7	110	20	10	6	-1	6,88
4	25	7	130	20	20	3	1	5,97
5	35	6	110	20	20	3	-1	5,91
6	35	6	130	20	10	6	1	6,97
7	35	7	110	10	20	6	1	6,03
8	35	7	130	10	10	3	-1	2,63

Baseado no diagrama de pareto do Delineamento Plackett-Burman (FIGURA 24), três variáveis incluindo porcentagem de sólidos solúveis (4), concentração do inóculo (5) e relação C:N (6) influenciaram significativamente a produção de  $\alpha$ -galactosidase, aumentando o seu valor quando os níveis das variáveis aumentaram. Subsequentemente, estas variáveis foram investigadas para determinação de suas concentrações ótimas.

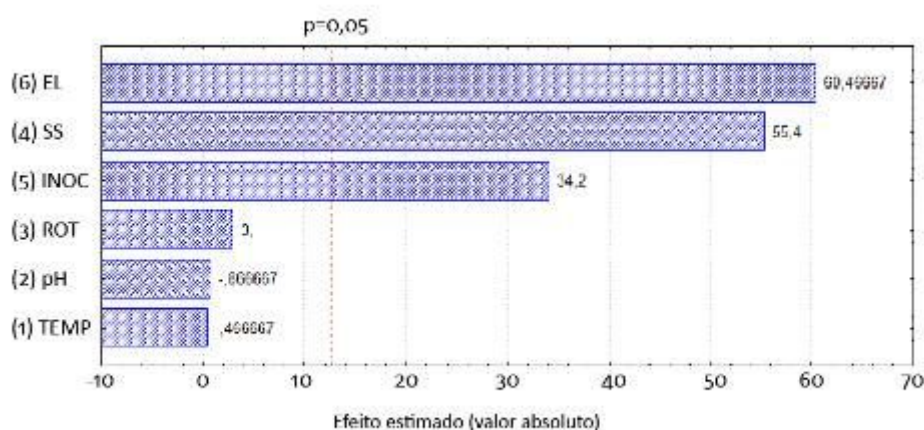


FIGURA 24 – DIAGRAMA DE PARETO PARA SELEÇÃO DE EFEITOS SIGNIFICATIVOS NA PRODUÇÃO DE  $\alpha$ -GALACTOSIDASE.

A significância dos efeitos foi determinada pelo Teste *t* de *Student* no nível de confiança de 95% e representado pela linha de corte em  $p = 0,05$ .

#### 4.3.2. Otimização das condições de cultura e composições do meio que afetam a produção de $\alpha$ -galactosidase utilizando Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR)

Os níveis de concentração de sólidos solúveis e concentração do inóculo foram aumentados em relação aos experimentos prévios, uma vez que os melhores valores reportados para a produção de ácido láctico a partir de vinhaça de soja pela cepa *L. agilis* LPB 56 foram 30 % e 25 %, respectivamente (KARP, 2007). Os níveis referentes à relação C:N foram escolhidos com o objetivo de comparar a relação ótima obtida previamente (C:N 6:1, item 4.2.2) e a relação C:N em meio de fermentação não suplementado. Os valores estão apresentados na TABELA 10.

TABELA 10 – ATIVIDADES DE  $\alpha$ -GALACTOSIDASE OBTIDAS APÓS 72 h DE FERMENTAÇÃO PARA DIFERENTES CONDIÇÕES DE CULTURA E COMPOSIÇÕES DO MEIO UTILIZADOS PARA O DELINEAMENTO COMPOSTO CENTRAL ROTACIONAL

Ensaio	Sólidos solúveis % (°Brix)	Tamanho do inóculo (% v/v)	Extrato de levedura (relação C:N)	Atividade $\alpha$ -gal total (U/mL)
1	25	15	6	4,87
2	35	15	6	0,873
3	25	35	6	4,39
4	35	35	6	2,38
5	25	15	12	4,64
6	35	15	12	0,788
7	25	35	12	4,02
8	35	35	12	1,90
9	22	25	9	6,98
10	38	25	9	2,13
11	30	8	9	2,86
12	30	42	9	6,52
13	30	25	2	2,65
14	30	25	14	7,02
15	30	25	9	7,55
16	30	25	9	7,31
17	30	25	9	7,60

As superfícies de resposta apresentadas nas FIGURAS 25, 26 e 27 e descritas através de uma Equação (1) polinomial de segunda ordem mostram os resultados para a atividade total de  $\alpha$ -galactosidase (extracelular + intracelular, U/mL) quando a concentração de sólidos solúveis, tamanho do inóculo e relação C:N foram variados, utilizando a cepa *Lactobacillus agilis* LPB 56. Foi observada a produção máxima de  $\alpha$ -galactosidase de 7,6 U/mL quando a concentração de sólidos solúveis foi de 30 %, concentração do inóculo 25 % (v/v) e relação C:N 9:1.

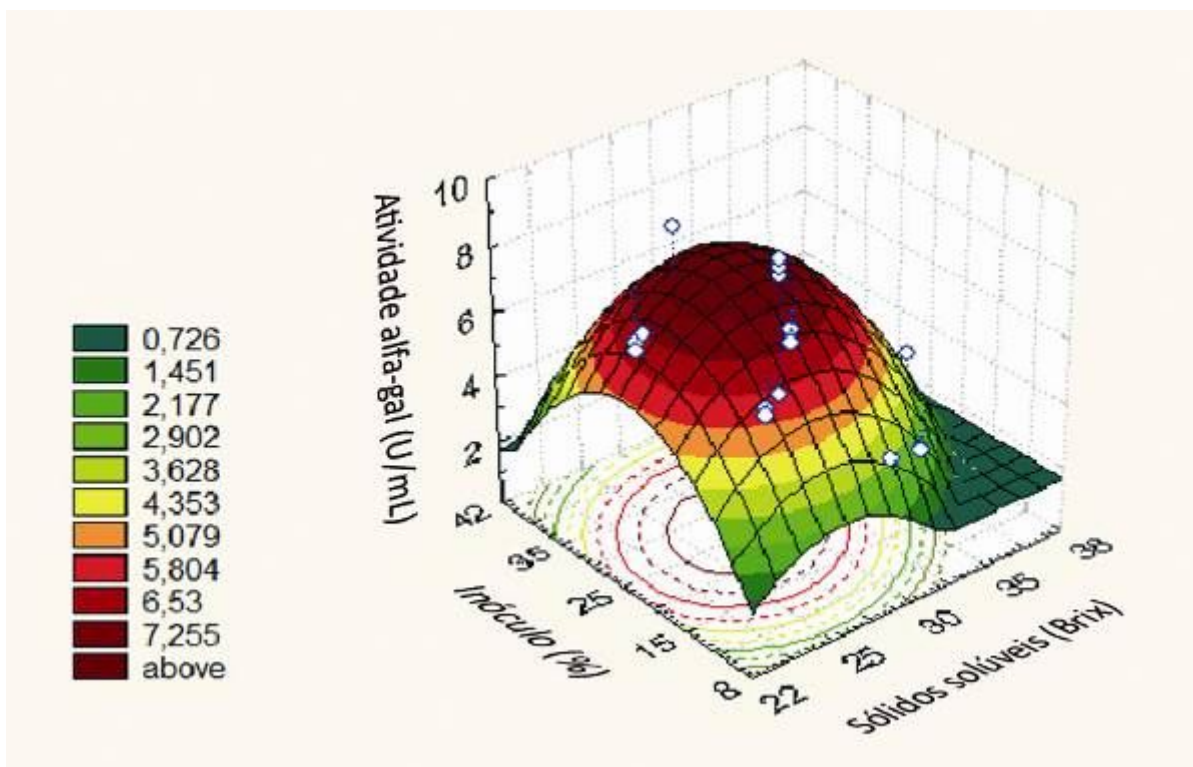


FIGURA 25 – SUPERFÍCIE DE RESPOSTA DESCRITA PELO MODELO, APRESENTANDO O EFEITO DOS SÓLIDOS SOLÚVEIS (°BRIX) E A PORCENTAGEM DE INÓCULO (% v/v) NA PRODUÇÃO DE  $\alpha$ -GALACTOSIDASE

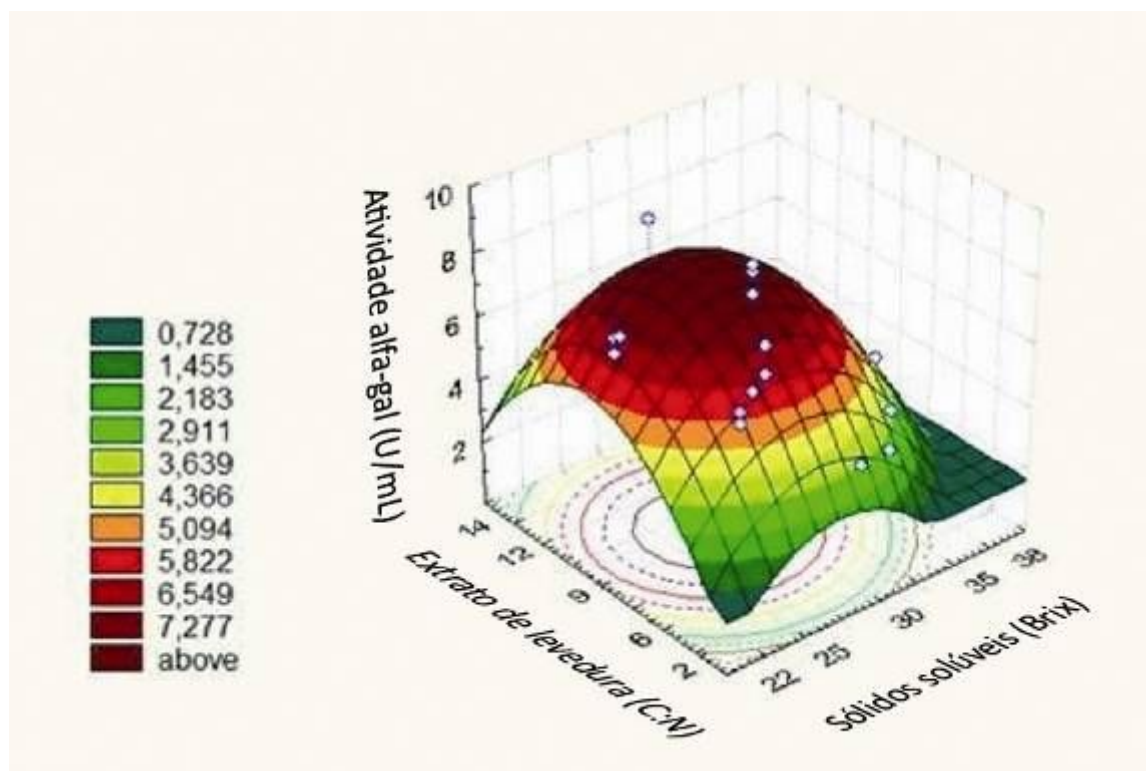


FIGURA 26 – SUPERFÍCIE DE RESPOSTA DESCRITA PELO MODELO, APRESENTANDO O EFEITO DOS SÓLIDOS SOLÚVEIS (°BRIX) E EXTRATO DE LEVEDURA (RELAÇÃO C:N) NA PRODUÇÃO DE  $\alpha$ -GALACTOSIDASE



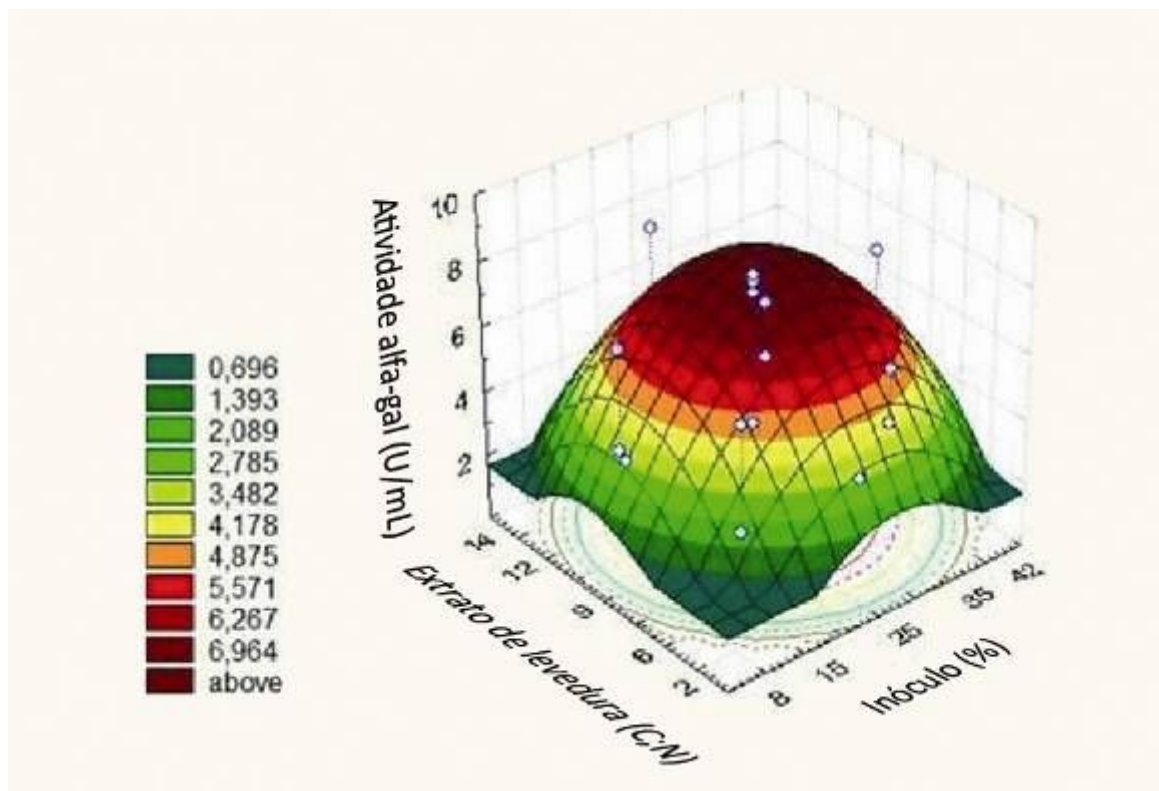


FIGURA 27 – SUPERFÍCIE DE RESPOSTA DESCRITA PELO MODELO, APRESENTANDO O EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DO INÓCULO (% v/v) E EXTRATO DE LEVEDURA (RELAÇÃO C:N) NA PRODUÇÃO DE  $\alpha$ -GALACTOSIDASE

EQUAÇÃO (1):

$$\text{Atividade (U/mL)} = 7,589 - 2,95013 \cdot [\text{Sólidos solúveis}] - 2,76238 \cdot [\text{Sólidos solúveis}]^2 - 2,66672 \cdot [\% \text{ Inóculo}]^2 - 2,56397 \cdot [\text{Relação C:N}]^2$$

De acordo com a TABELA 11, a variável significativa que mais afetou a resposta foi sólidos solúveis % (°Brix), por apresentar o maior efeito (valor absoluto) no termo quadrático (2,76238). O modelo revelou um coeficiente de correlação ( $R^2$ ) de 0,81647.

TABELA 11 – IDENTIFICAÇÃO DE VARIÁVEIS SIGNIFICATIVAS ( $p < 0,05$ ) PARA A PRODUÇÃO DE  $\alpha$ -GALACTOSIDASE UTILIZANDO DELINEAMENTO COMPOSTO CENTRAL ROTACIONAL

Fator	Coeficientes	Erro padrão	t-valor	p-valor
Sólidos solúveis (°Brix) (L)	- 1,47507	0,423785	- 3,48070	0,010257
Sólidos solúveis (°Brix) (Q)	- 1,38119	0,466875	- 2,95838	0,021154
Inóculo % (Q)	- 1,33336	0,466875	- 2,85593	0,024480
Extrato de levedura (C:N) (Q)	- 1,28199	0,466875	- 2,74589	0,028674



A verificação do modelo foi realizada em frascos Erlenmeyer (cinco experimentos, em duplicata) para condições dentro da faixa experimental. Os resultados estão apresentados na TABELA 12. O desvio relativo médio do modelo com relação aos valores reais foi de 25%.

TABELA 12 – EXPERIMENTOS PARA VERIFICAÇÃO DO MODELO PREVISTO DE PRODUÇÃO DE  $\alpha$ -GALACTOSIDASE. OS RESULTADOS REPRESENTAM A MÉDIA DAS DUPLICATAS

Ensaio	Sólidos solúveis % (°Brix)	Inóculo (% v/v)	Extrato de levedura (relação C:N)	Previsto (U/mL)	Experimental (U/mL)
1	25,0	25	12:1	5,81	5,67 $\pm$ 0,17
2	27,5	20	11,5:1	6,47	6,09 $\pm$ 0,08
3	30,0	15	9,0:1	4,92	6,65 $\pm$ 0,08
4	32,5	30	7,5:1	4,12	3,87 $\pm$ 0,12
5	35,0	35	6,0:1	0	1,95 $\pm$ 0,09

#### 4.4. PRODUÇÃO DE $\alpha$ -GALACTOSIDASE EM BIORREATOR SOB CONDIÇÕES OTIMIZADAS

O estudo cinético da produção de  $\alpha$ -galactosidase em biorreator sob condições otimizadas (porcentagem de sólidos solúveis 30 °Brix, concentração de inóculo 25% v/v e relação C:N 9:1) está apresentado na TABELA 13.

A maior atividade enzimática (11,07 U/mL) foi alcançada em 144 h de fermentação. Este tempo relativamente longo se aproxima com resultados de Karp (2007), que obteve concentração máxima de ácido láctico em 168 h utilizando a mesma linhagem *L. agilis* LPB 56. Foi observado que a atividade enzimática não reduziu após 72 h, como nos experimentos prévios. Isto ocorreu provavelmente devido ao controle de pH contínuo com hidróxido de potássio 5 N, além da adição de  $\text{CaCO}_3$  no início da fermentação. A atividade máxima de  $\alpha$ -galactosidase foi obtida durante a fase estacionária e a fração intracelular apresentou uma atividade enzimática consideravelmente maior que a fração extracelular, o que está de acordo com Yoon *et al.* (2008). Melhorias no rendimento do produto conforme obtido neste estudo (de 7,60 U/mL em frascos Erlenmeyer para 11,07 U/mL no biorreator) são esperadas no fermentador devido ao melhor controle dos parâmetros de processo. O aumento na atividade da  $\alpha$ -galactosidase poderia ser atribuído principalmente à manutenção do pH, e possivelmente também à influência da concentração de

oxigênio dissolvido e à sua transferência para as células promovida pela agitação.

A literatura relatou valores de atividade da  $\alpha$ -galactosidase de 2,0 U/mL (extracelular) em fermentação submersa por *Bacillus stearotherophilus* utilizando farelo de soja (GOTE *et al.*, 2004) e 5,0 U/mL em fermentação submersa por *Lactobacillus fermentum* em meio sintético com base em rafinose (LEBLANC *et al.*, 2004<sup>b</sup>), ambos em 24 h.

Comparando-se a produtividade máxima obtida (0,206 U/mL/h), foi encontrado na literatura uma produtividade semelhante (0,208 U/mL/h), obtida por LEBLANC *et al* (2004<sup>b</sup>) cuja fermentação foi realizada em biorreator. Aplicando fermentação no estado sólido, Somiari e Balogh (1995), obtiveram produtividade máxima de 0,13 U/mL/h utilizando como substrato farelo de trigo e 0,08 U/mL/h com farelo de arroz. Gote (2004<sup>a</sup>) obteve 0,09 U/mL/h usando farelo de soja como substrato.

TABELA 13 – ESTUDO CINÉTICO PARA PRODUÇÃO DE  $\alpha$ -GALACTOSIDASE, BIOMASSA, ÁCIDO LÁCTICO E CONSUMO DE AÇÚCAR

Tempo (h)	Biomassa (g/L) <sup>a</sup>	Açúcar Total (g/L)	Ácido Lático (g/L)	Atividade Extra-Celular (U/mL)	Atividade Total (U/mL)	Proteína (mg/mL)	Atividade Específica (U/mg)	Produtividade (U/mL/h)
0	0,272	105,6	7,826	0	0,03487	-	0,2019	0
24	3,92	53,03	48,44	0,324	4,939	0,141	35,05	0,206
48	6,83	26,49	66,79	2,111	6,839	0,148	46,32	0,142
72	7,05	5,704	72,20	3,002	7,374	0,164	44,78	0,102
96	7,77	4,924	71,29	3,356	7,600	0,173	43,93	0,079
120	7,46	4,744	72,54	3,652	7,545	0,183	41,25	0,063
144	8,22	4,432	70,30	5,925	11,07	0,213	51,97	0,077
168	8,12	4,432	73,57	3,480	9,703	0,196	49,41	0,058
192	8,26	3,952	73,65	3,301	10,1	0,225	44,83	0,053

<sup>a</sup>Peso seco

Os resultados de atividade da  $\alpha$ -galactosidase e a degradação dos oligossacarídeos rafinose e estaquiose estão demonstrados na FIGURA 28. A estaquiose foi consumida completamente em 72 h, transformando-se em açúcares mais simples, dentre eles, rafinose.

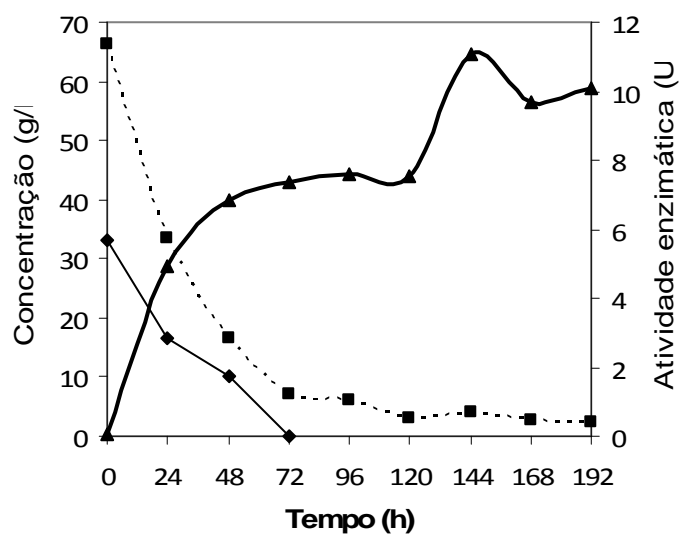


FIGURA 28 – CONSUMO DOS OLIGOSSACARÍDEOS E PRODUÇÃO DA ENZIMA  $\alpha$ -GALACTOSIDASE POR FERMENTAÇÃO DE VINHAÇA DE SOJA A 30°BRIX DURANTE 192 h. ATIVIDADE ENZIMÁTICA (▲), CONCENTRAÇÃO DE ESTAQUIOSE (♦) E RAFINOSE (■)

#### 4.5. BALANÇO DE MASSA

A FIGURA 29 mostra o balanço de massa de um processo integrado, em que o principal resíduo do processo de concentrado proteico de soja foi empregado como substrato para produção de etanol,  $\alpha$ -galactosidase e ácido láctico.

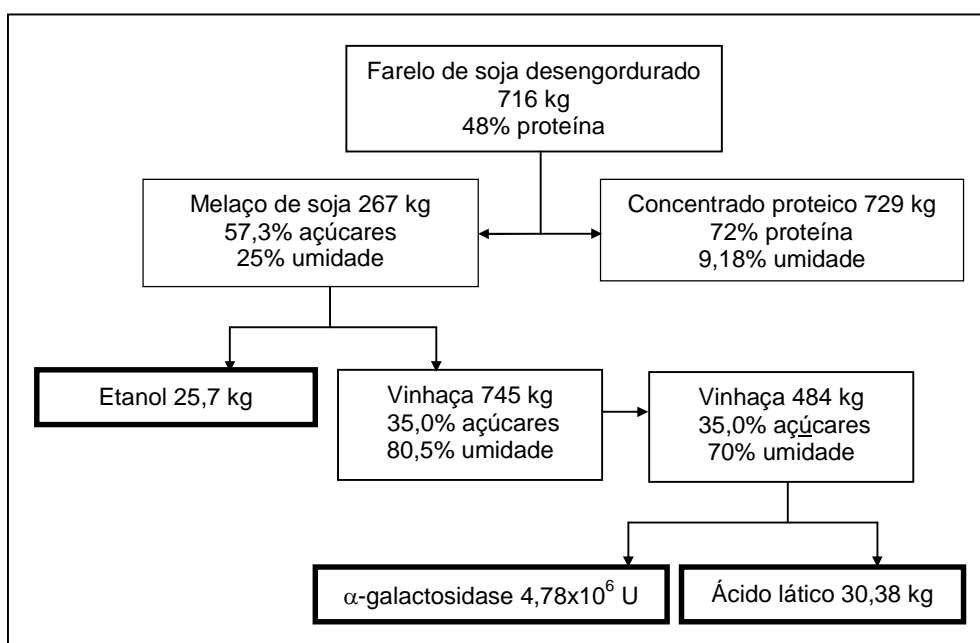


FIGURA 29 – BALANÇO DE MASSA DO PROCESSO DE PRODUÇÃO DE  $\alpha$ -GALACTOSIDASE A PARTIR DE VINHAÇA DE SOJA. PORCENTAGEM EM BASE SECA

Os valores foram calculados a partir de dados reais obtidos de uma companhia processadora de soja baseado no processo de uma tonelada de soja (in natura). A produção de farelo de soja desengordurado, concentrado proteico e etanol a partir do melaço já estão implementados em escala industrial. As etapas incluindo a concentração da vinhaça, ou seja, perda da água ligada (de 80,5 para 70% de umidade) e a produção concomitante de  $\alpha$ -galactosidase e ácido láctico foram desenvolvidas em escala laboratorial.

## 4.6. PURIFICAÇÃO PARCIAL DA $\alpha$ -GALACTOSIDASE

### 4.6.1. Precipitação com sulfato de amônio e diálise

O tratamento com sulfato de amônio foi realizado variando a concentração de saturação em 20%, 40%, 60% e 80%. O precipitado foi ressuspenso em tampão acetato de sódio 100 mM e dialisado conforme descrito no item 3.6.2 .

TABELA 14 – ATIVIDADE ENZIMÁTICA RELATIVA AO EXTRATO BRUTO APÓS PRECIPITAÇÃO COM SULFATO DE AMÔNIO

Saturação (%)	Atividade sobrenadante (%)	Atividade precipitado (%)
0	100	-
20	65,0	0
40	23,6	21,0
60	15,4	24,1
80	1,09	24,0
40 (20+20)	20,7	35,0
80 (20+20+20+20)	3,06	16,0

Aplicando a precipitação fracionada, através de incrementos de 20% até completar 40% de saturação, obteve-se precipitação de 79,3% da enzima, porém a atividade da  $\alpha$ -galactosidase recuperada no precipitado foi de 35% do total, representando uma perda de atividade de 44,14% (TABELA 14). Nesta etapa a enzima foi concentrada 1,1 vezes.

Segundo Amersham Biosciences (2004), algumas proteínas podem ser danificadas pelo sulfato de amônio. Esta técnica demonstrou que não é a mais adequada para a estratégia de purificação desta  $\alpha$ -galactosidase, portanto,

prosseguiu-se com a aplicação da amostra na cromatografia de troca iônica e filtração em gel.

#### 4.6.2. Cromatografia de troca iônica e filtração em gel

##### 4.6.2.1. Otimização da cromatografia de troca iônica em microtubos eppendorf

Foi realizado um estudo preliminar com a resina aniônica (DEAE – Sepharose) e resina catiônica (SP – Sepharose Fast Flow). A resina DEAE-Sepharose apresentou melhores resultados quando comparada à outra resina. Isto se deve à especificação técnica de cada tipo de resina, a qual exige determinadas condições como o valor de pH. A resina foi equilibrada com solução tampão Glicina-HCl, variando o pH em 3,0 e 4,0, porém como a enzima não é estável neste nível, os valores de atividade enzimática tenderam à nulidade (dados não mostrados). Enquanto que na resina aniônica, utilizando solução tampão Tris-HCl 50 mM, variando o pH em 6,0 e 7,0, a enzima apresentou maior estabilidade e melhores resultados na adsorção nestas condições. Nestes testes, também foi estudado o efeito da diluição do extrato bruto (1:4, 1:5, e 1:6). A diluição que apresentou maior atividade enzimática foi 1:5 (TABELA 15). Com relação ao pH, concluiu-se que não há diferença significativa entre o pH 6,0 e 7,0.

TABELA 15 – EXPERIMENTOS PRÉVIOS PARA OTIMIZAÇÃO DOS PARÂMETROS DA CROMATOGRAPHIA DE TROCA IÔNICA EM COLUNA ANIÔNICA (DEAE-SEPHAROSE)

Condições		Atividade da $\alpha$ -galactosidase (U/mL)
pH	Diluição da amostra	
6,0	1:4	3,128 $\pm$ 0,09
7,0		3,550 $\pm$ 0,11
6,0	1:5	6,110 $\pm$ 0,12
7,0		6,175 $\pm$ 0,16
6,0	1:6	4,400 $\pm$ 0,13
7,0		3,980 $\pm$ 0,11

Com base nestes resultados, conclui-se que a diluição e o seu condicionamento a pH adequado influenciou a adsorção. A eluição normalmente é mais eficiente quando feita através de um gradiente linear (LIMA *et al.*, 2001). Portanto, esses resultados foram utilizados como base para os experimentos subsequentes em coluna, com gradiente de 0 a 1 M de NaCl.

#### 4.6.2.2. Purificação em colunas

O extrato bruto produzido a partir de *L. agilis* em vinhaça de soja foi então submetido às etapas de purificação em colunas: cromatografia de troca iônica e filtração em gel. Um resumo das etapas está apresentado na TABELA 16. Durante as etapas de purificação a atividade da  $\alpha$ -galactosidase foi determinada conforme item 3.8.2. e o teor proteico determinado pelo método de Bradford, conforme descrito no item 3.8.4.

O perfil de eluição da cromatografia em coluna de troca iônica DEAE-Sepharose revelou a presença de apenas um pico proteico com atividade de  $\alpha$ -galactosidase, que foi eluído com 0,35 – 0,45 M de NaCl. Os resultados de atividade da  $\alpha$ -galactosidase, D.O. a 280 nm e gradiente de NaCl estão demonstrados na FIGURA 30.

As frações (33 a 37) contendo 7 mL em cada, foram reunidas e liofilizadas. Nesta etapa a enzima foi purificada 3,2 vezes, com um rendimento de 81 % (TABELA 16).

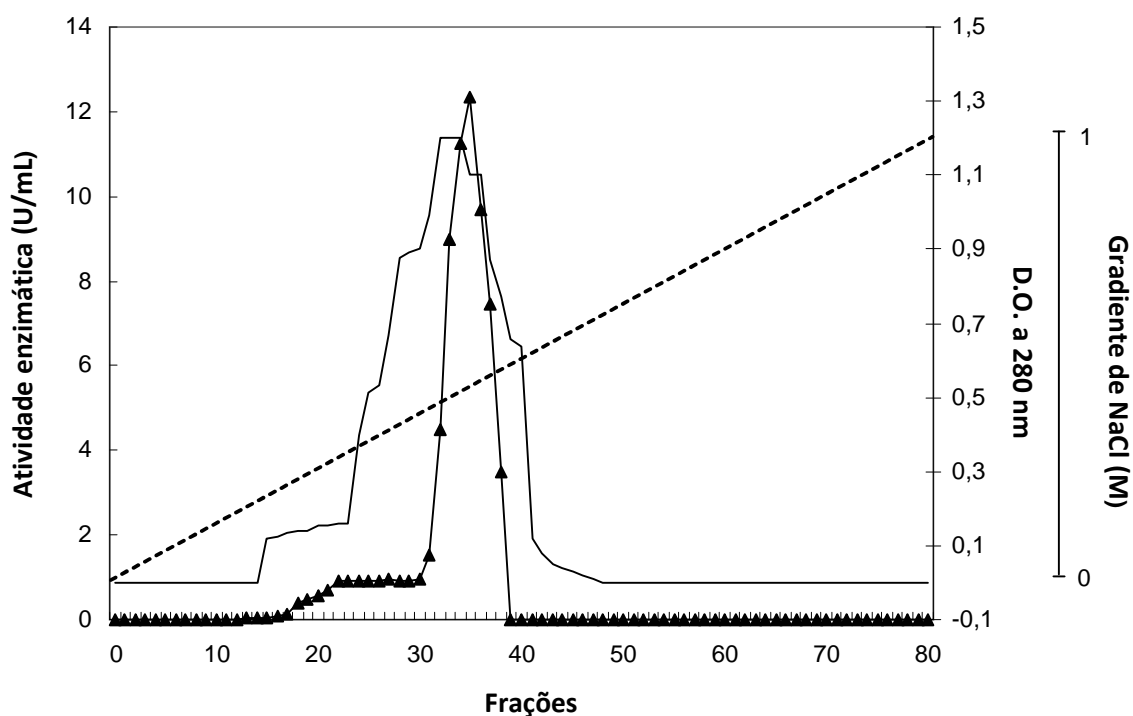


FIGURA 30 – PERFIL CROMATOGRÁFICO DE ELUIÇÃO DA  $\alpha$ -GALACTOSIDASE DE *L. agilis* EM COLUNA ANIÔNICA DEAE-SEPHAROSE. ATIVIDADE DE  $\alpha$ -GALACTOSIDASE ( $\blacktriangle$ ), PERFIL DE PROTEÍNA A 280 nm (—), GRADIENTE DE NaCl (---)

As frações eluídas, liofilizadas e ressuspendidas em tampão acetato de sódio foram submetidas à cromatografia de filtração em gel, utilizando uma coluna de filtração em gel Superose 6.

Somente um pico com atividade de  $\alpha$ -galactosidase foi observado na fração 9 (FIGURA 31). Nesta etapa a enzima foi purificada 7,21 vezes, com um rendimento de 3,82 % (TABELA 16).

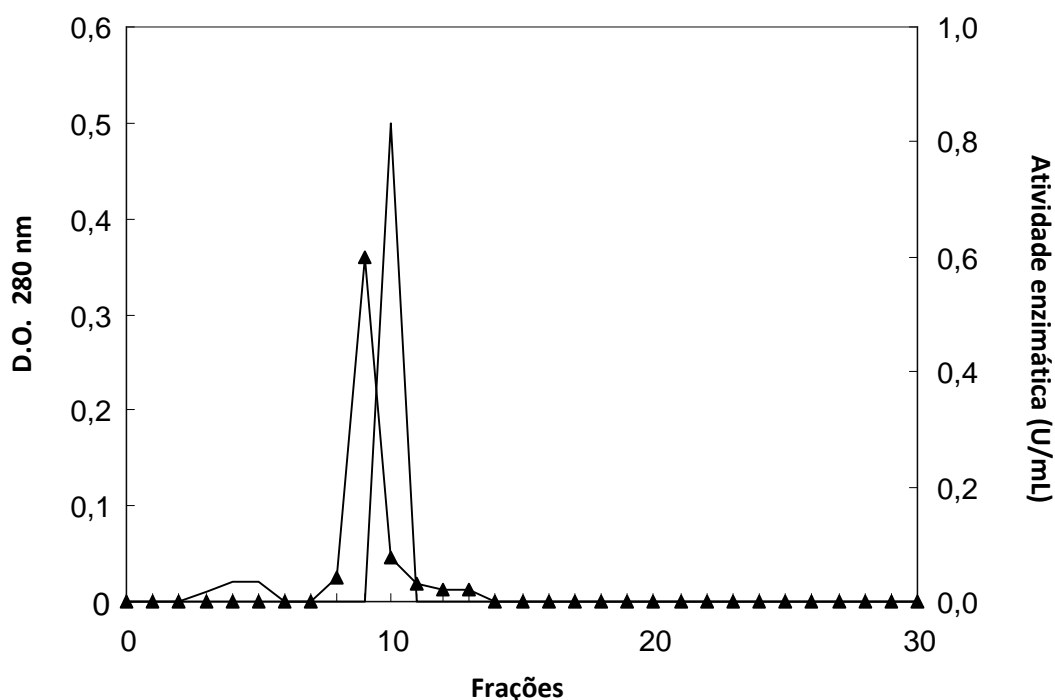


FIGURA 31 – PERFIL CROMATOGRÁFICO DE ELUIÇÃO DA  $\alpha$ -GALACTOSIDASE DE *L. agilis* EM COLUMA DE FILTRAÇÃO EM GEL SUPEROSE 6. ATIVIDADE DE  $\alpha$ -GALACTOSIDASE (▲), D.O. 280 nm (—)

A diálise foi importante para a remoção de excesso de sal de acetato de sódio presente na amostra.

Durante as etapas de purificação a atividade da  $\alpha$ -galactosidase foi determinada conforme item 3.8.2, e o teor proteico determinado pelo método de Bradford conforme descrição no item 3.8.4 e densidade óptica conforme item 3.8.7.

TABELA 16 – RESUMO DOS RESULTADOS DE PURIFICAÇÃO

Etapas de Purificação	Proteína Total (mg)	Atividade Total (U)	Atividade específica (U/mg)	Recuperação (%)	Fator de Purificação
Extrato bruto	10,58	550,0	51,97	100,0	1
DEAE-SEPHAROSE	2,68	445,50	166,30	81,0	3,2
SUPEROSE 6	0,056	21,0	375,0	3,82	7,21

A técnica de fracionamento da  $\alpha$ -galactosidase baseada em troca iônica mostrou que a enzima foi adsorvida na resina, sendo eluída em um único pico, evidenciando tratar-se de enzimas com predominância de cargas negativas.

Purificações parciais também são encontradas na literatura. VIANA *et al.*, 2005, purificaram parcialmente a  $\alpha$ -galactosidase de soja, obtendo uma purificação de 26 vezes com um rendimento de 25%.  $\alpha$ -Galactosidase de *Penicillium griseoroseum* também foi purificada parcialmente através de precipitação com sulfato de amônio e cromatografia de gel filtração (FALKOSKI *et al.*, 2006).

#### 4.6.3. Eletroforese

Para estimativa da massa molecular da  $\alpha$ -galactosidase, as frações que apresentaram maior atividade enzimática, eluídas na coluna DEAE-Sepharose (FIGURA 32) e Superose 6 (FIGURA 33), foram submetidas à eletroforese, em gel de poliacrilamida 12,5% sob condições desnaturantes. O perfil de migração das proteínas está apresentado nas FIGURAS 32 e 33.

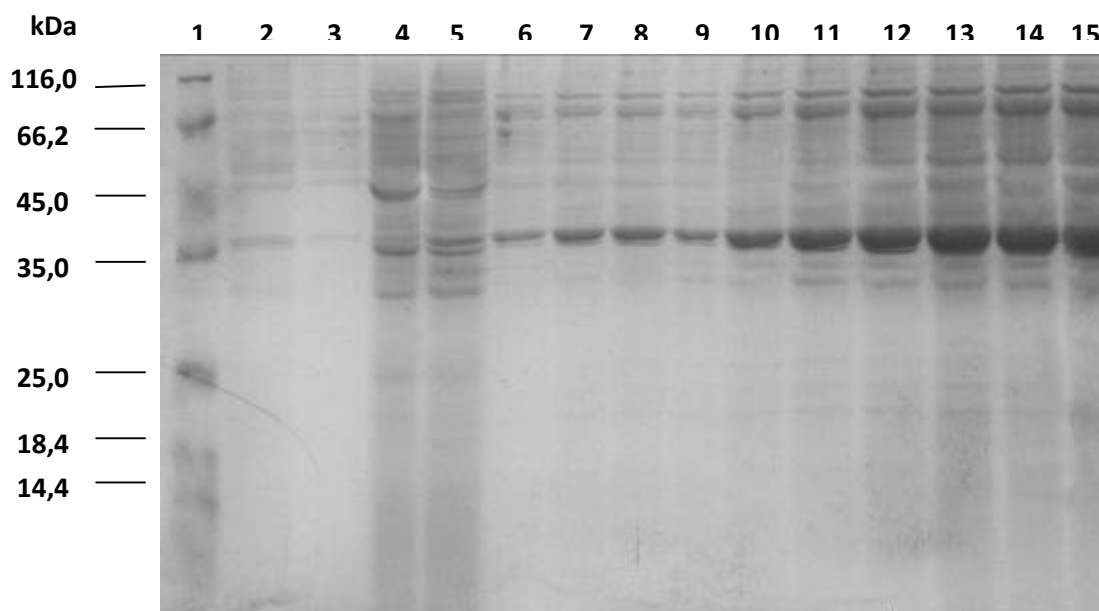


FIGURA 32 - ELETROFORESE DESNATURANTE (SDS-PAGE 12,5%) DA  $\alpha$ -GALACTOSIDASE DE *L. agilis* CORADO COM COOMASSIE BLUE. 1- MARCADORES DE MASSA MOLECULAR; 2- EXTRATO BRUTO; 3- EXTRATO BRUTO DILUÍDO 1:5; 4- AMOSTRA PRECIPITAÇÃO COM SULFATO DE AMÔNIO 80%; 5- AMOSTRA ANTERIOR LIOFILIZADA; 6 A 8- FRAÇÃO DEAE-SEPHAROSE (5  $\mu$ L, 8  $\mu$ L, 10  $\mu$ L); 9 A 15- FRAÇÃO DEAE-SEPHAROSE LIOFILIZADA (2  $\mu$ L, 4  $\mu$ L, 8  $\mu$ L, 10  $\mu$ L, 12  $\mu$ L, 15  $\mu$ L, 20  $\mu$ L)



A análise eletroforética em gel de poliacrilamida indicou a presença de várias bandas proteicas no extrato bruto (FIGURA 32, canaletas 2 e 3). Três bandas proteicas mais intensas foram visualizadas na fração enzimática proveniente de troca iônica (FIGURA 32, canaletas 6 a 15). Na fração enzimática proveniente da cromatografia de filtração em gel, o perfil de bandas proteicas foi similar (FIGURA 33).

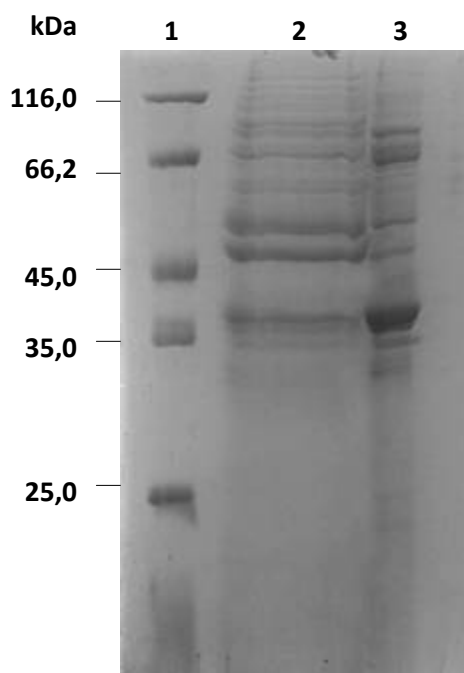


FIGURA 33 - ELETROFORESE DESNATURANTE (SDS-PAGE 12,5 %) DA  $\alpha$ -GALACTOSIDASE DE *L. agilis* CORADO COM COOMASSIE BLUE. 1- MARCADORES DE MASSA MOLECULAR; 2- EXTRATO BRUTO; 3- FRAÇÃO SUPEROSE 6

Através do software “Image J”, foram obtidos valores estimados de massa molecular para três bandas proteicas que tiveram um aumento na intensidade, sugerindo então que estas contêm  $\alpha$ -galactosidase correspondendo a 85, 65 e 37 kDa (FIGURA 34).

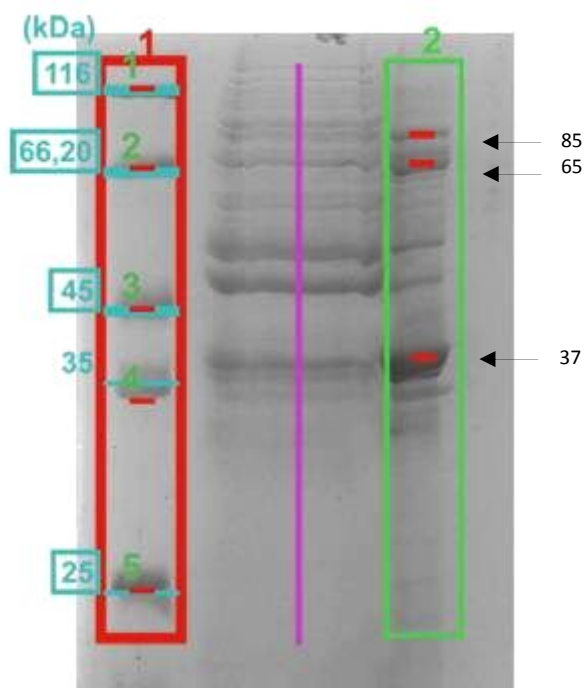


FIGURA 34 - ESTIMATIVA DA MASSA MOLECULAR DA  $\alpha$ -GALACTOSIDASE DE *L. agilis* (85, 65, 37 kDa).

Como comparativo,  $\alpha$ -galactosidases de micro-organismos apresentaram em trabalhos anteriores valores de massa molecular como a determinada em *Penicillium purpurogenum*, 67 kDa (SHIBUYA *et al.*, 1995), *Thermomyces lanuginosus*, 57,0 kDa (PUCHART *et al.*, 2000) e em *Debaryomyces hansenii* UFV1, 60 kDa (VIANA *et al.*, 2006). Gote *et al.* (2006) encontrou valor de massa molecular de 79,9 kDa de  $\alpha$ -galactosidase de *Bacillus stearothermophilus* (NCIM-5146). Valores de massa molecular menores foram encontrados em  $\alpha$ -galactosidases de origem vegetal como em sementes de *Tachigali multijuga*, 38 kDa (FIALHO, 2007) e em sementes de *Vigna unguiculata*, 33 kDa (OLIVEIRA-NETO *et al.*, 1998).

Na FIGURA 35, estão representadas bandas proteicas de  $\alpha$ -galactosidase bacteriana, fúngica e de semente, bem como as bandas correspondentes ao extrato proteico parcialmente purificado do cultivo de *L. agilis*. Dentre essas, supomos que a banda que mais provavelmente represente a  $\alpha$ -galactosidase seja a de 85 kDa, pela semelhança com o peso molecular da enzima do *B. stearothermophilus*, com 79,9 kDa.

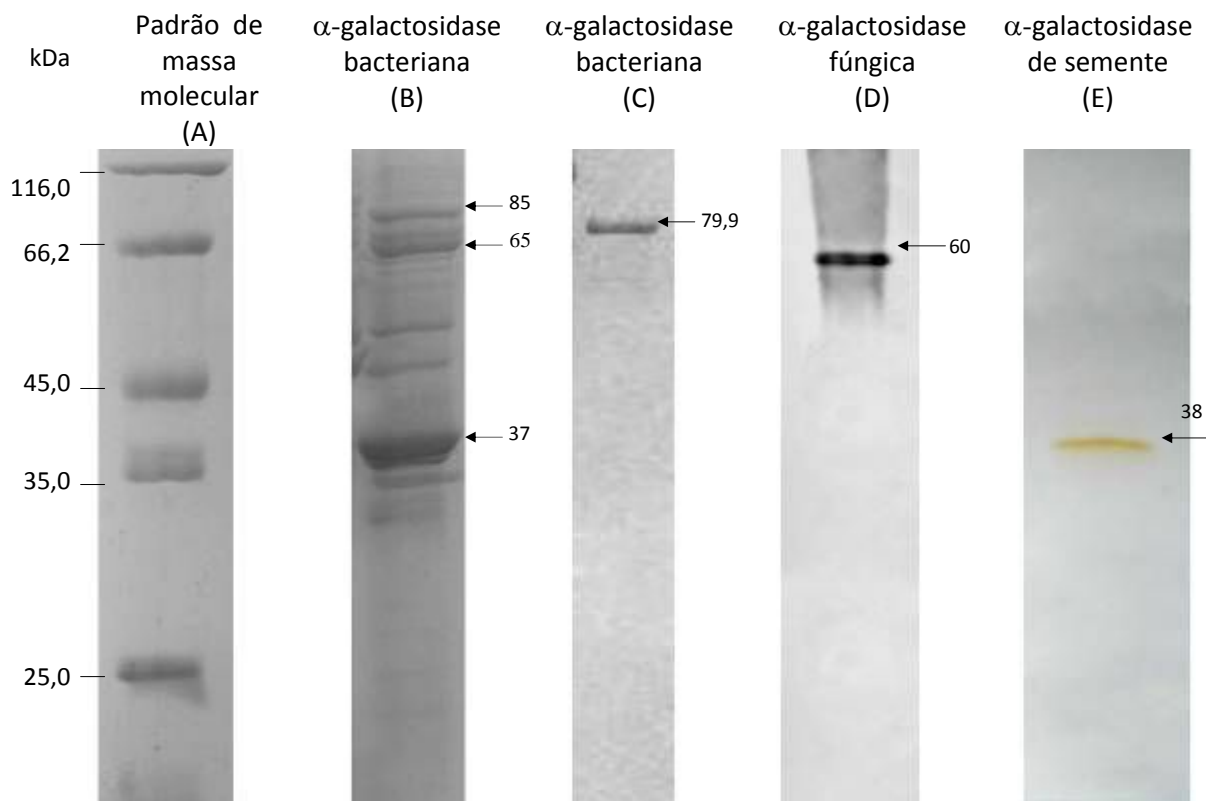


FIGURA 35 – COMPARAÇÃO DA MASSA MOLECULAR DE: (A) MARCADORES DE MASSA MOLECULAR; (B) prováveis bandas de  $\alpha$ -GAL de *L. agilis* LPB 56, referente a este trabalho (85, 65 e 37 kDa); (C)  $\alpha$ -GAL de *Bacillus stearotherophilus*, 79,9 kDa (GOTE *et al.*, 2006); (D)  $\alpha$ -GAL de *Debaryomyces hansenii* UFV-1, 60 kDa (VIANA *et al.*, 2006); (E)  $\alpha$ -GAL de *Tachigali multijuga*, 38 kDa (FIALHO, 2007).

## 4.7. CARACTERIZAÇÃO ENZIMÁTICA

### 4.7.1. Efeito do pH na atividade da $\alpha$ -galactosidase

A atividade da  $\alpha$ -galactosidase foi testada na faixa de pH compreendida entre 1,0 e 10,0, utilizando pNPG como substrato. Foi encontrada máxima atividade na faixa de pH 5,0 - 5,5. Não apresentou atividade em pH abaixo de 4,5 e baixa atividade em pH maior que 7,0. (FIGURA 36). Este declínio pode resultar da constituição de uma forma iônica não adequada do substrato ou da enzima (ou de ambos), ou da inativação da enzima, ou ainda da combinação desses efeitos (SEGEL, 1979).

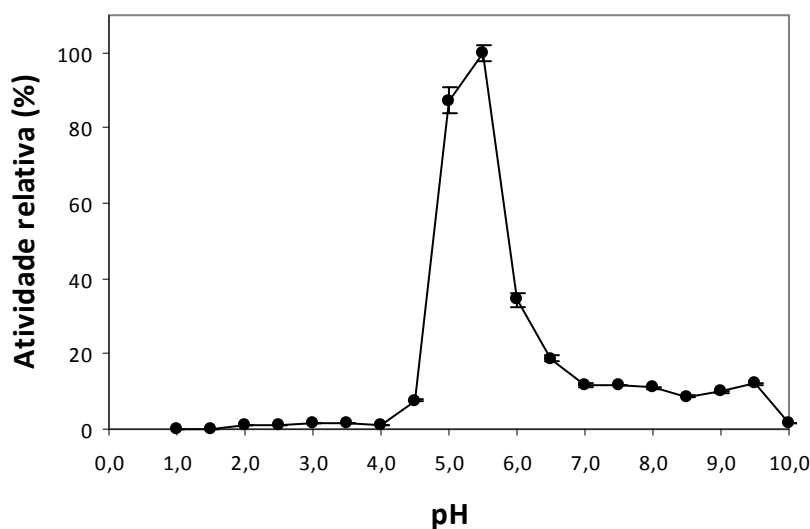


FIGURA 36 – EFEITO DO pH NA ATIVIDADE DA  $\alpha$ -GALACTOSIDASE DE *L. agilis* LPB 56. ATIVIDADE ENZIMÁTICA MÁXIMA FOI DETERMINADA COMO 100%

Resultados semelhantes foram encontrados por Fialho (2007) para  $\alpha$ -galactosidase de sementes de soja apresentando atividade máxima na faixa de 5,0 - 5,5. Leblanc *et al.*, (2004<sup>b</sup>), estudaram o efeito do pH na produção de  $\alpha$ -galactosidase de *L. fermentum* com resultado de atividade máxima em pH 5,5. Gote *et al.* (2004<sup>a</sup>), obteve  $\alpha$ -galactosidase de *Bacillus stearothermophilus* com atividade ótima entre pH 6,5 a 7,0. Valores menores de pH ótimo também foram encontrados para a  $\alpha$ -galactosidase, em sua maioria fungos, *Aspergillus niger*, pH 4,5 (MANZANARES *et al.*, 1998) e *Aspergillus fumigatus*, pH 4,0-4,5 (REZENDE *et al.*, 2005).

#### 4.7.2. Efeito do pH na estabilidade da $\alpha$ -galactosidase

O efeito do pH na estabilidade da enzima foi testado incubando-se na faixa de pH 3,5 a 6,5 a 4°C durante 24, 48 e 72 h. Após este período de tratamento, a atividade enzimática foi realizada conforme descrito no item 2.8.2.

A atividade relativa e a estabilidade da  $\alpha$ -galactosidase em diferentes valores de pH estão mostrados na FIGURA 37.

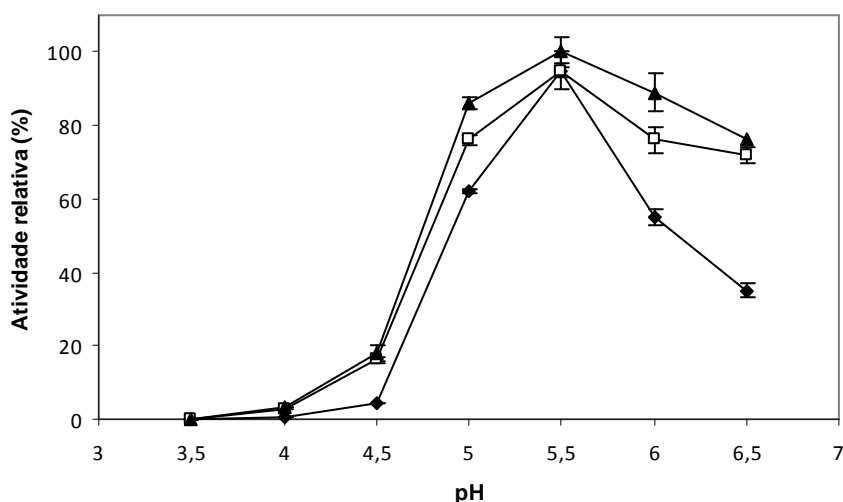


FIGURA 37 – ESTABILIDADE AO pH DA  $\alpha$ -GALACTOSIDASE DE *L. agilis* LPB 56 POR 72 (◆), 48 (◻) E 24 h (▲), APÓS PRÉ-INCUBAÇÃO DA ENZIMA NA FAIXA DE pH DE 3,5 A 6,5

Observou-se que por um período de tempo mais longo em pH diferente do ótimo, a atividade da  $\alpha$ -galactosidase é reduzida. A enzima reteve 100% de sua atividade quando pré-incubada em pH 5,5 durante 72 h. Em pH 5,0, cerca de 15% da atividade relativa ainda foi mantida após 24 h, indicando que, possivelmente, a enzima pode exercer sua atividade catalítica.

A  $\alpha$ -galactosidase de *Bacillus stearothermophilus* (NCIM-5146) reteve 70% da atividade quando pré-incubada a 5°C por 12 h em pH 3,0 e 90% em pH 10,0. Cao *et al.* (2007), testou a estabilidade da enzima de *Rhizopus sp.* F78 em diferentes pH a 37°C durante 30 min, obtendo o resultado de 80% de atividade residual entre pH 5,0 e 10,0.

A estabilidade da enzima ao pH, depende de muitos fatores como temperatura, força iônica, natureza química do tampão, concentração de íons metálicos contaminantes, concentração de substrato e concentração da enzima (SEGEL, 1979). Portanto, o declínio da atividade da  $\alpha$ -galactosidase em algumas faixas de pH provavelmente pode ser devido a uma constituição iônica não adequada da enzima nessas condições.

O conhecimento dos efeitos sobre a ação catalítica da enzima são fatores muito importantes, especialmente quando se considera o desenvolvimento de tecnologias consistentes para utilização no setor industrial. A estabilidade, ou seja, a capacidade da enzima de manter sua ação catalítica ao longo do tempo, representa

o “shelf-life” do produto e é especialmente importante quando se trata de produtos líquidos.

#### 4.7.3. Efeito da temperatura na atividade da $\alpha$ -galactosidase

Para a determinação da temperatura ótima de atividade da  $\alpha$ -galactosidase, sua atividade foi testada na faixa de 30 a 55°C. Os picos de atividade foram detectados entre 35 e 40°C, valores próximos à temperatura corporal. A temperatura de atividade máxima da enzima foi a 40°C. Entretanto, na temperatura de 55°C ocorreu a perda total de atividade enzimática.

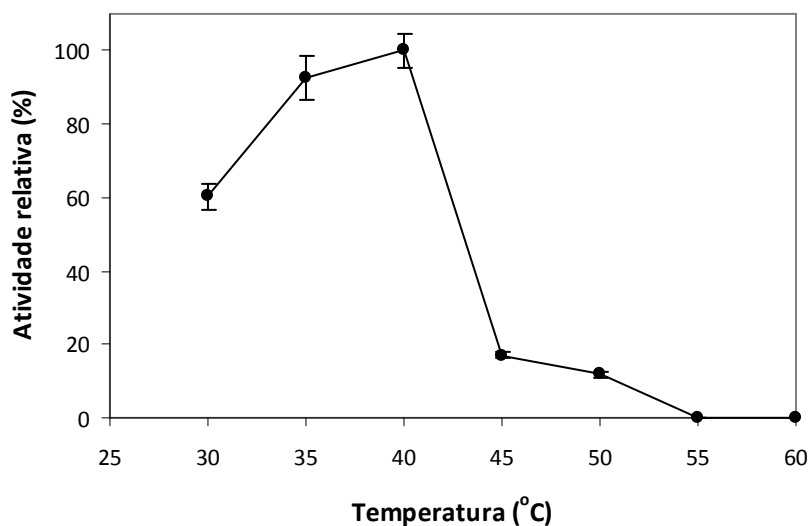


FIGURA 38 – EFEITO DA TEMPERATURA NA ATIVIDADE DA  $\alpha$ -GALACTOSIDASE DE *L. agilis* LPB 56

Temperatura ótima semelhante ao descrito neste trabalho foi encontrada por Yoon & Hwang (2008), no valor de 37°C, para  $\alpha$ -galactosidase de *L. curvatus* R08. No entanto, Cao *et al.* (2007), obtiveram temperatura ótima mais alta, em torno de 50°C para  $\alpha$ -galactosidase de *Rhizopus sp.* F78, porém, reteve menos de 25% da atividade em temperatura acima de 60°C. As demais enzimas relatadas também não apresentaram termoestabilidade.

#### 4.7.4. Análise de termoestabilidade

A enzima apresentou estabilidade na faixa de 20 a 40°C após 1 h de incubação, mantendo a atividade até 40°C, rapidamente decrescendo a 50°C. A enzima reteve aproximadamente 90 % da atividade original após incubação por 1 h a 20 e 30°C, e em torno de 70 % a 40°C, mas aproximadamente 83% da atividade foi perdida em 10 min de incubação quando submetida a temperatura de 50°C.

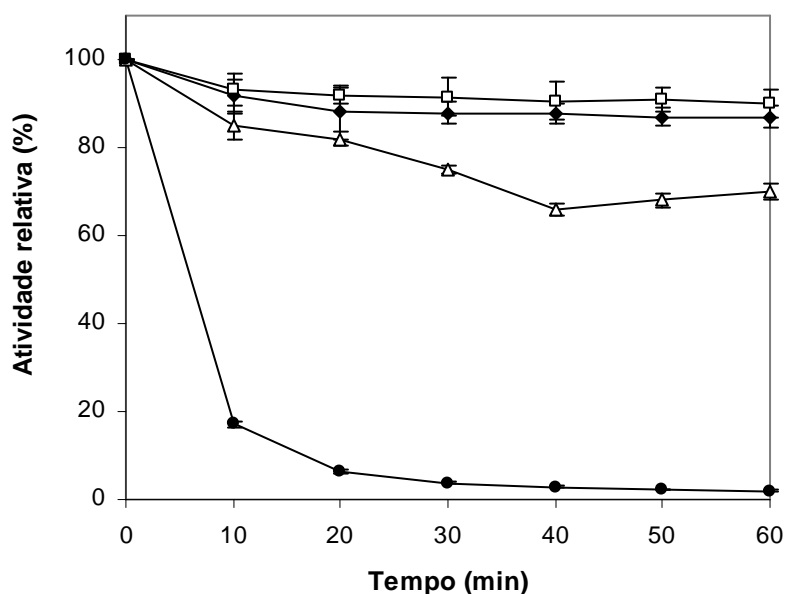


FIGURA 39 – EFEITO DA TEMPERATURA NA ESTABILIDADE DA  $\alpha$ -GALACTOSIDASE DE *L. agilis* LPB 56. A PREPARAÇÃO ENZIMÁTICA FOI PRÉ-INCUBADA POR 60 min A 20°C (□), 30°C (◆), 40°C (Δ), 50°C (●)

A faixa de temperatura obtida para atividade ótima segue os valores encontrados para  $\alpha$ -galactosidases de bactérias (YOON e HWANG, 2008). A termoestabilidade encontrada neste estudo pode ser suficiente para fermentação de soja, devido à aplicação como *starter* para a fabricação de iogurtes geralmente conduzida em 25 - 45°C.

Yoon e Hwang (2008), estudaram a estabilidade da  $\alpha$ -galactosidase de *L. curvatus* R08, e concluíram que a enzima é estável na faixa de temperatura de 20 a 40°C após 3 h de incubação, manteve a atividade acima de 40°C, reduzindo rapidamente a 50°C.

#### 4.7.5. Efeito do congelamento e refrigeração na atividade da $\alpha$ -galactosidase

A avaliação da atividade enzimática durante o armazenamento em refrigerador (4°C) e congelador (-20°C) demonstrou os resultados conforme descrito na TABELA 17.

TABELA 17 – ESTABILIDADE DA ENZIMA APÓS REFRIGERAÇÃO E CONGELAMENTO

	Tempo (dias)			
	15	30	45	60
Atividade relativa (%) após refrigeração	98,0	95,3	94,1	90,0
Atividade relativa (%) após congelamento	95,5	91,4	80,0	84,5

O método de refrigeração e congelamento aplicado reduziu em 10% e em 15,5% a atividade da  $\alpha$ -galactosidase, respectivamente, não demonstrando conservação em sua totalidade. A atividade no congelamento em 60 dias apresentou maior perda da atividade possivelmente pela formação de cristais de gelo, causando desta forma, a desnaturação estrutural. Outras metodologias devem ser estudadas para melhorar a estabilidade enzimática como por exemplo a adição de substâncias estabilizantes da atividade enzimática, visto que o armazenamento é um dos fatores importantes quando se trata de processos que envolvem enzimas.

#### 4.7.6. Efeito de íons metálicos na atividade da $\alpha$ -galactosidase

O efeito de íons na atividade da  $\alpha$ -galactosidase foi determinado pré-incubando soluções destes compostos com a preparação enzimática, seguido do ensaio normal de atividade conforme descrito no item 3.8.2. A atividade relativa foi calculada considerando a atividade da enzima sem adição de íons como 100 %. Este estudo foi realizado para se avaliar a influência de alguns íons na atividade da  $\alpha$ -galactosidase produzida.

A  $\alpha$ -galactosidase foi completamente inibida por  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  e  $\text{Mn}^{2+}$ , e foi parcialmente inibida por  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Ag}^{2+}$  e  $\text{Ca}^{2+}$ . Redução na atividade da  $\alpha$ -galactosidase de *Bacillus stearothermophilus* por  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  e  $\text{Ag}^{2+}$  na concentração de 1 mM foi relatado por Gote *et al.* (2006). Atividade de  $\alpha$ -galactosidase de *L. fermentum* foi totalmente inibida por  $\text{Hg}^{2+}$  na concentração de 0,1 mM (GARRO, 1996). De acordo



com VIANA *et al.* (2006), a enzima de *Debaryomyces hansenii* UFV-1 foi completamente inibida por  $\text{Cu}^{2+}$  e  $\text{Ag}^{2+}$  na concentração de 2 mM. A atividade da  $\alpha$ -galactosidase de sementes também apresentou inibição total por  $\text{Hg}^{2+}$  na concentração de 2 mM (FIALHO, 2007).

O íon  $\text{Hg}^{2+}$  é um forte inibidor de  $\alpha$ -galactosidase das diversas fontes. Este fato sugere a possível presença de grupos tiol no sítio catalítico da enzima (CHURCH *et al.*, 1980).

TABELA 18 – EFEITO DE ÍONS SOBRE A ATIVIDADE DA  $\alpha$ -GALACTOSIDASE

EFEITO <sup>a</sup>	ATIVIDADE RELATIVA (%) $\pm$ DP
Controle <sup>b</sup>	100
$\text{Cu}^{2+}$	$3,81 \pm 0,21$
EDTA	$95,59 \pm 1,36$
$\text{Hg}^{2+}$	0
$\text{Fe}^{2+}$	$90,67 \pm 3,15$
Zn	$58,22 \pm 1,38$
$\text{Mn}^{2+}$	$5,25 \pm 0,10$
$\text{Mg}^{2+}$	$94,36 \pm 3,78$
Ag	$72,99 \pm 0,99$
$\text{Ca}^{2+}$	$82,92 \pm 2,66$

<sup>a</sup> A concentração final dos compostos no ensaio foi de 1 mM.

<sup>b</sup> Controle significa sem adição de íons.

A atividade da  $\alpha$ -galactosidase apresentou baixa inibição por EDTA (4,41%),  $\text{Ca}^{2+}$  (17,08%),  $\text{Fe}^{2+}$  (9,33%),  $\text{Mg}^{2+}$  (5,64%). Inibição baixa ou nenhuma na atividade da enzima por EDTA também foi obtida por alguns autores (FIALHO, 2007; GARRO, 1996). A  $\alpha$ -galactosidase de *Debaryomyces hansenii* UFV-1 (VIANA *et al.*, 2006) também apresentou baixa inibição por  $\text{Ca}^{2+}$ . A atividade não foi afetada por  $\text{Mg}^{2+}$ , concordando com Gote *et al.*, (2004). Segundo Garro (1996), a atividade de  $\alpha$ -galactosidase de *L. fermentum* não foi afetada por  $\text{Fe}^{2+}$ .

#### 4.7.7. Determinação das constantes de Michaelis-Menten ( $K_M$ ) e da velocidade máxima ( $V_{\max}$ )

O efeito da concentração do substrato pNPG na velocidade da reação catalisada pela  $\alpha$ -galactosidase foi determinado pela curva de Michaelis-Menten (FIGURA 40). As constantes  $K_M$  e  $V_{\max}$  foram estimadas de acordo com o método de

Lineweaver-Burk, utilizando o gráfico duplo recíproco (apresentado na FIGURA 41), correspondendo a 1,189 mM e 10,989 mM pNP/min, respectivamente.

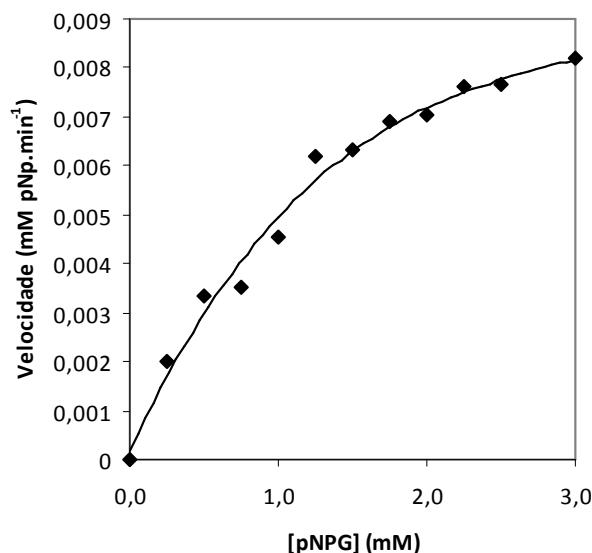


FIGURA 40 - EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DO SUBSTRATO pNPG NA ATIVIDADE DE  $\alpha$ -GALACTOSIDASE PRODUZIDA POR *L. agilis* LBP 56

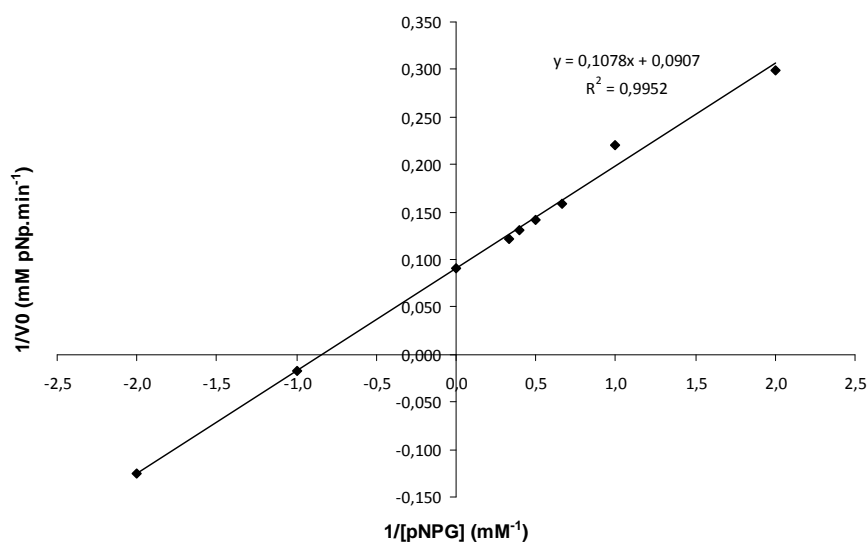


FIGURA 41 - GRÁFICO DO DUPLO RECÍPROCO (LINEWEAVER-BURK) PARA A VELOCIDADE DE REAÇÃO EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE pNPG PARA DETERMINAR OS VALORES DE  $K_M$  E  $V_{max}$

A afinidade da  $\alpha$ -galactosidase pelo substrato pNPG obtida neste trabalho foi similar à  $\alpha$ -galactosidase de *Aspergillus niger* (ADEMARK *et al.*, 2001) apresentando um valor de  $K_M$  de 1,4 mM. Cao *et al.* (2007) reportou para a  $\alpha$ -galactosidase de uma linhagem de *Rhizopus sp.*, um valor de  $K_M$  de 2,9 mM, utilizando pNPG como

substrato. Para a  $\alpha$ -galactosidase de *Bacillus stearothermophilus*, o valor de  $K_M$  calculado foi de 0,625 mM (GOTE *et al.*, 2004) e para a  $\alpha$ -galactosidase de *Debaryomyces hansenii* o valor de  $K_M$  para a hidrólise de pNPG foi 0,30 mM (VIANA *et al.*, 2006).

## 5. CONCLUSÕES

Este trabalho demonstrou que é possível produzir  $\alpha$ -galactosidase a partir da vinhaça de soja com rendimentos satisfatórios, ou seja, 7,60 U/mL em frascos Erlenmeyer e 11,07 U/mL em biorreator em batelada.

As investigações experimentais indicaram que a fermentação deve ser conduzida com o meio de cultivo possuindo 30% de sólidos solúveis, inoculado com 25% (v/v) na vinhaça de soja (C:N 9:1) durante 144 h, quando utilizou-se a linhagem selecionada *L. agilis* LPB 56.

De acordo os resultados já obtidos, o processo demonstra perspectivas interessantes para o reaproveitamento de um resíduo agrícola que poderia representar um problema ambiental, uma vez que a vinhaça produzida pela fermentação do melaço de soja apresenta 77,02 g O<sub>2</sub>/L de demanda bioquímica de oxigênio (SIQUEIRA *et al.*, 2008). A possibilidade de produzir um produto de alto valor comercial a partir de um resíduo de baixo custo é benéfico para o desenvolvimento industrial, uma vez que a maioria dos estudos são desenvolvidos a partir de um meio de cultivo sintético.

O critério de purificação adotado promoveu um aumento na atividade específica, com fator de 3,2 e recuperação de 81% utilizando resina aniônica DEAE-Sepharose. Concluiu-se também que a  $\alpha$ -galactosidase produzida é uma enzima com caráter aniônico.

A atividade máxima da enzima foi observada em valores de pH 5,0 a 5,5, e a temperatura ótima foi de 40°C. A enzima apresentou estabilidade na faixa de 20 a 40°C após 1 h de incubação, mantendo a atividade até 40°C, rapidamente decrescendo a 50°C. Com relação à estabilidade durante o armazenamento, a enzima apresentou atividade relativa de 90% sob refrigeração após 60 dias e 84% sob congelamento neste mesmo período.

Após a purificação parcial foram identificadas bandas proteicas equivalentes às massas moleculares de 85, 65 e 37 kDa que, de acordo com a literatura, podem corresponder às da  $\alpha$ -galactosidase, sendo mais provável o valor de 85 kDa, já que foram encontrados valores mais baixos para  $\alpha$ -galactosidases de sementes.

A caracterização e purificação da  $\alpha$ -galactosidase de *L. agilis* LPB 56 representa um significativo fator na otimização deste processo com a visão da

efetiva aplicação industrial, para obtenção de produtos processados a partir de soja com baixo conteúdo de rafinose e estaquiose.

## 6. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Em função do exposto anteriormente, algumas recomendações consideradas importantes estão citadas a seguir:

Recomenda-se um estudo mais aprofundado sobre a estratégia de purificação da enzima utilizando outras resinas e incorporando outras técnicas como ultrafiltração, cristalização e liofilização.

É interessante aplicar o extrato enzimático em gel nativo de poliacrilamida, ou seja, em condições não desnaturantes para visualização da atividade da  $\alpha$ -galactosidase no próprio gel.

É importante ser avaliado um estudo complementar com testes de aplicação da  $\alpha$ -galactosidase *in vitro* e *in vivo*, podendo ser na forma sólida ou líquida.

A técnica de espectrometria de massa (MALDI-TOF) poderá ser aplicada como um método para dar continuidade na confirmação do peso molecular da  $\alpha$ -galactosidase.

Um processo por meio de fermentação sólida, também poderá ser uma tecnologia a ser testada, observando sua condição custo/benefício.

## REFERÊNCIAS

ADEMARK, P.; LARSSON, M.; TJERNELD, F.; STALBRAND, H. **Multiple  $\alpha$ -galactosidases from *Aspergillus niger*: purification, characterization and substrate specificities.** Enzyme and Microbial Technology. v. 29, p. 441-448, 2001.

AMERSHAM BIOSCIENCES. **Ion exchange chromatography & chromatofocusing. Principles and methods.** Disponível em (<http://www1.gelifesciences.com>). Acesso em: 05 de janeiro de 2009.

ANISHA G. S., PREMA P. **Reduction of non-digestible oligosaccharides in horse gram and Green gram flours using crude alpha-galactosidase from *Streptomyces griseoloabus*.** Food Chemistry, 106(3), 1175-1179, 2008.

ASSOCIAÇÃO AMERICANA DE SOJA. **Quality of the United States Soybean Crop.** Disponível em (<http://www.soygrowers.com/international/quality/US-SB-Quality-07.pdf>). Acesso em: 25 de março de 2007.

BRADFORD, M.M. **A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.** Analytical Biochemistry. v.72, p.248-254, 1976.

BRACHT A.; ISHII-IWAMOTO E. L. **Métodos de Laboratório em Bioquímica.** Barueri, SP: Manole, 2003.

CAO Y.; YANG P.; SHI P.; WANG Y.; LUO H.; MENG K.; ZHANG Z.; WU N.; YAO B.; FAN Y. **Purification and characterization on a novel protease-resistant  $\alpha$ -galactosidase from *Rhizopus* sp. F78 ACCC 30795.** Enzyme and Microbial Technology. v. 41, p. 835-841, 2007.

CARR, F.J.; CHILL, D.; MAIDA, N. **The lactic acid bacteria: a literature survey.** Critical Reviews in Microbiology. V. 28, (4). p. 281-370, 2002.

CHURCH, F.C.; MEYERS, S.P. & SRINIVASAN. V.R. **Isolation and characterization of alpha-galactosidase from *Pichia guilfiermondii*.** Developments in Industrial Microbiology. Society for Industrial Microbiology, Arlington, VA. v.21., pp. 339-348, 1980.

COUSINS, B. **Enzimas na nutrição de aves.** I Simpósio Internacional ACAV—Embrapa sobre Nutrição de Aves. Concórdia, SC, 1999.

CRUZ, R.; BATISTELA, J. C.; WOSIACKI, G. **Microbial  $\alpha$ -galactosidase for soymilk processing.** Journal of Food Science, Chicago. V.46, p.1196-1200, 1981.

DEY, P.M.; PRIDHAM, J.B. **Biochemistry of  $\alpha$ -galactosidases.** Advanced Enzymology. v.36, p. 91-130, 1972.

DONKOR, O. N.; HENRIKSSON, A.; VASILJEVIC, T.; & SHAH, N. P.  **$\alpha$ -galactosidase and proteolytic activities of selected probiotic and dairy cultures in fermented soymilk.** Food Chemistry. v. 104, p. 10-20, 2007.

FALKOSKI, D.L., GUIMARÃES, V.M., CALLEGARI, C.M., REIS, A.P. DE REZENDE, S.T. **Processing of soybean products by semipurified plant and microbial alpha-galactosidases.** Journal of Agricultural and Food Chemistry. V. 27, p. 10184-10190, 2006.

FIALHO L.S. **Purificação e caracterização de uma  $\alpha$ -galactosidase em sementes de *tachigali multijuga* e clonagem parcial do gene da estaquiose sintase de soja.** Universidade Federal de Viçosa. Minas Gerais, 2007.

FIALHO L. S.; GUIMARÃES V. M.; CALLEGARI C. M.; REIS A. P.; BARBOSA D. S.; BORGES E. E. L.; MOREIRA M. A.; REZENDE S. T. **Characterization and biotechnological application of an acid  $\alpha$ -galactosidase from *Tachigali multijuga* Benth. Seeds.** Phytochemistry. V. 69, p. 2579–2585, 2008.

GARRO, M.; VALDEZ, G. F.; OLIVER, G. & GIORI, G. S. **Purification of alpha-galactosidase from *Lactobacillus fermentum*.** Journal of Biotechnology. V. 45, 103-109, 1996.

GOTE, M. **Isolation, Purification and Characterization of Thermostable  $\alpha$ -galactosidase from *Bacillus stearothermophilus* (NCIM-5146).** Ph. D. Thesis. University of Pune for the Degree of Doctor of Philosophy in the Department of Microbiology. India. 2004<sup>a</sup>.

GOTE, M.; UMALKAR, H.; KHAN, I. & KHIRE J. **Thermostable  $\alpha$ -galactosidase from *Bacillus stearothermophilus* (NCIM 5146) and its application in the removal of flatulence causing factors from soymilk.** Process Biochemistry. V. 39, p. 1723-1729, 2004.

GOTE, M.; KHAN, I.; GOKHALE D.; BASTAWDE K.; KHIRE J. **Purification, characterization and substrate specificity of thermostable  $\alpha$ -galactosidase from *Bacillus stearothermophilus* (NCIM-5146).** Process Biochemistry. V 41, p. 1311–1317, 2006.

HOBEN, H. J. & SOMASEGARAN, P. **Comparison of the pour, spread, and drop plate methods for enumeration of *Rhizobium spp.* in inoculants made from presterilized peat.** Applied and Environmental Microbiology, 44 (5), p. 1246-1247, 1982.

KAMALY, K.M. Bifidobacteria fermentation of soybean milk. Food Research International. V. 30, p. 675-682, 1997.

KARP, S. G. **Production of L-lactic acid from the soybean vinasse.** Master dissertation. Federal University of Paraná/Universities of Provence and of the Mediterranean Sea, Brazil / France, 2007.



KOTWAL, S. M.; GOTE, M. M.; SAINKAR, S. R.; KHAN, M. I. & KHIRE, J. M. **Production of alpha-galactosidase by thermophilic fungus *Humicola* sp. in solid-state fermentation and its application in soyamilk hydrolysis.** Process Biochemistry. V. 33, p. 337-343, 1998.

KU, S.; WEI, L.S.; STEIMBERG, M.P.; NELSON, A.I.; HYMOWITZ, T. **Extraction of oligosaccharides during cooking of whole soybean.** Journal Food Science. V.41, p.361-364, 1976.

LAEMMLI, U.K. **Cleavage of structural proteins during the assembling of the head of the bacteriophage T7.** Nature. V. 277, p. 680-685, 1970.

LAZO P.S.; OCHOA A.G.; GASCÓN S.  **$\alpha$ -Galactosidase from *Saccharomyces carlsbergensis*. Cellular localization, and purification of the external enzyme.** Eur. J. Biochemical. V. 77, p. 375-382, 1977.

LEBLANC, J. G.; SILVESTRONI, A.; CONNES, C.; JUILLARD, V.; GIORI, G. S.; PIARD, J. C. & SESMA, F. **Reduction of non-digestible oligosaccharides in soymilk: application of engineered lactic acid bacteria that produce alpha-galactosidase.** Genetics and Molecular Research. V. 3, p. 432-440, 2004<sup>a</sup>.

LEBLANC, J. G.; GARRO, M. S. & GIORI, G. S.. **Effect of pH on *Lactobacillus fermentum* growth, raffinose removal,  $\alpha$ -galactosidase activity and fermentation products.** Applied Microbiology Biotechnology, 65, p. 119-123, 2004<sup>b</sup>

LEBLANC, J. G.; PIARD, J. C.; SESMA, F. & GIORI, G. S. ***Lactobacillus fermentum* CRL 722 is able to deliver active  $\alpha$ -galactosidase activity in the small intestine of rats.** FEMS Microbiology Letters, v. 248, p. 177-182, 2005.

LEHNINGER, A. L. **Bioquímica.** 4<sup>a</sup> ed. São Paulo: Edgard Blücher, 2007.

LIMA, U.A.; AQUARONE E.; BORZANI W.; SCHMIDELL W. **Biotechnologia industrial. Processos fermentativos e enzimáticos.** São Paulo, SP: Edgard Blücher, 2001.

LIU, S.Q. **Practical implications of lactate and pyruvate metabolism by lactic acid bacteria in food and beverage fermentations.** International Journal of Food Microbiology v. 83 (2), p. 115-131, 2003.

MANZANARES, P.; GRAAFF L. H. & VISSER, J. **Characterization of galactosidases from *Aspergillus niger*: purification of a novel  $\alpha$ -galactosidase activity.** Enzyme and Microbial Technology, v. 22, p. 383-390, 1998.

MARSHAK, D.R.; KADONAGA, J.T.; BURGESS, R.R.; KNUTH M.W.; BRENNAN W.A.; LIN S. **Strategies for protein purification and characterization – a laboratory course manual.** United States of America. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1996.

MARTÍNEZ-VILLALUENGA, C.; FRÍAS, J.; VIDAL-VALVERDE, C. **Functional Lupin seeds (*Lupinus albus* L. And *Lupinus luteus* L.) after extraction of  $\alpha$ -galactosides**. Food Chemistry. V.98, p.291-299, 2006.

MULIMANI, V. H.; THIPPESWAMY, S. & RAMALINGAM. **Enzymatic degradation of oligosaccharides in soybean flours**. Food Chemistry. V. 59, (2), p. 279-282, 1997.

MULYOWIDARSO, R. K.; FLEET, G. H. ; BUCKLE, K. A. **Changes in the concentration of carbohydrates during the soaking of soybeans for tempe production**. International Journal of Food Science and Technology, Oxford, V.26, p.595-606, 1991.

NEUS, J.D.; FEHR, W.F.; SCHNEBLY, S.R. **Agronomic and seed characteristics of soybean with reduced raffinose and stachyose**. Crop Science. V.45, p.589-592, 2005.

OLIVEIRA, G.; GUIMARÃES, V. M.; LIMA, E. E.; FIALHO, L. S.; OLIVEIRA, M. G. A. & REZENDE, S. T. **Purificação e caracterização de alfa-galactosidases de sementes de *Platymiscium pubescens micheli***. Revista árvore. V. 29, p. 535-543, 2005.

OLIVEIRA-NETO, O.B.; GOMES-FILHO, E.; PRISCO, J.T.; ENÉAS-FILHO, J. **Partial purification and properties of cotyledonary  $\alpha$ -galactosidase from three cultivars of *Vigna unguiculata***. Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal. V.10, p.91-96, 1998.

OSAANA N.; DONKOR, A.; HENRIKSSON, T.; VASILJEVIC, N.P.; SHAH.  **$\alpha$ -Galactosidase and proteolytic activities of selected probiotic and dairy cultures in fermented soymilk**. Food Chemistry 104: 10–20, 2007.

PESSOA JR. A.; KILIKIAN B.V. **Purificação de Produtos Biotecnológicos**. Barueri, SP: Manole, 2005.

PUCHART, V.; VRŠANSKÁ, M.; BHAT, M.K.; BIELY, P. **Purification and characterization of  $\alpha$ -galactosidase from a thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus***. Biochimica et Biophysica Acta. V.1524, p.27-37, 2000.

PUGALENTHI, M.; SIDDHURAJU, V.; VADIVEL, V. **Effect of soaking followed by cooking and the addition of  $\alpha$ -galactosidase on oligosaccharides levels in different *Canavalia* accessions**. Journal of Food Composition and Analysis. V.19, p.512-517, 2006.

REDDY, N.R.; SALUNKHE, D.K. **Changes in oligosaccharides during germination and cooking of black gram and fermentation of black gram/rice blend**. Cereal Chemistry. V.57, p.354-360, 1980.

REZENDE, S. T.; GUIMARÃES, V. M.; RODRIGUES, M. C. & FELIX, C.R. **Purification and characterization of an alpha-galactosidase from *Aspergillus***

**fumigatus**. Brazilian Archives of Biology and Technology. V. 48, (2), p. 195-202, 2005.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA A. F. **Planejamento de experimentos e otimização de Processos: uma estratégia sequencial de planejamentos**. 1ª edição. Campinas, SP: Casa do Pão Editora, 2005.

ROISSART, H. & LUQUET, F. M. **Bactéries Lactiques – Aspects fondamentaux et technologiques**. Uriage: Loriga, 1994.

RUIZ, A.; ACOSTA, M.; CISNEROS, F. **Utilizacion de enzimas en los procesos de obtencion de leche y derivados de la soya**. Alimentaria. V.33, p.127-132, 1995.

SAID, S. & PIETRO, R. C. L. R. 2004. **Enzimas como Agentes Biotecnológicos**. Ribeirão Preto: Legis Summa, 2004.

SANADA, C.T.N.; KARP, S.G.; SPIER, M.R.; PORTELLA, A.C.; GOUVÊA, P. M.; YAMAGUISHI, C.T.; VANDENBERGHE, L.P.S.; PANDEY, A.; SOCCOL, R.C.; **Utilization of soybean vinasse for  $\alpha$ -galactosidase production**. Food Research International, p. 487-496, 2009.

SAT, I.G.; KELES, F. **The effect of soaking and cooking on the oligosaccharide content of Seker a dry bean variety (*P. vulgaris*, L) grown in Turkey**. Pakistan Journal of Nutrition. V.1, p.206-208, 2002.

SEGEL, I. H. **Biochemical calculations. How to solve mathematical problems in general biochemistry**. John Wiley & Sons: 1979.

SHABALIN K.A.; KULMINSKAYA A.A.; SAVEL'EV A.N.; SHISHLYANNIKOV S.M.; NEUSTROEV K.N. **Enzymatic properties of  $\alpha$ -galactosidase from *Trichoderma reesei* in the hydrolysis of galactooligosaccharides**. Enzyme and Microbial Technology. V. 30, p. 231-239, 2002.

SHANKAR S.K.; MULIMANI V.H.  **$\alpha$ -Galactosidase production by *Aspergillus oryzae* in solid-state fermentation**. Bioresource Technology. V. 98, p. 958-961, 2007.

SHEVCHENKO, A.; WILM, M.; VORM, O. E MANN, M. **Mass spectrometric sequencing of proteins from silver-stained polyacrylamide gels**. Analytical Chemistry. V. 68, p. 850-858, 1996.

SHIBUYA, H.; KOBAYASHI, H.; PARK, G. G.; KOMATSU, Y.; SATO, T.; KANEKO, R.; NAGASAKI, H.; YOSHIDA, S.; KASAMO, K.; KUSAKABE, I. **Purification and some properties of  $\alpha$ -galactosidase from *Penicillium purpurogenum***. Biosci., Biotechnol., Biochem. V.59, 2333-2335, 1995

SHMIDELL W.; LIMA U.A.; AQUARONE E.; BORZANI W. **Biotecnologia Industrial. Engenharia bioquímica**. São Paulo, SP: Edgard Blücher, 2001.

SIQUEIRA, P. F. **Production of bio-ethanol from soybean molasses by *Saccharomyces cerevisiae***. Master dissertation. Federal University of Paraná/ Universities of Provence and of the Mediterranean Sea, Brazil / France, 2006.

SIQUEIRA, P. F.; KARP, S. G.; CARVALHO, J. C.; STURM, W.; RODRÍGUEZ-LÉON, J. A.; THOLOZAN, J. L.; SINGHANIA, R. R.; PANDEY, A. & SOCCOL, C. R. **Production of bio-ethanol from soybean molasses by *Saccharomyces cerevisiae* at laboratory, pilot and industrial scales**. *Bioresource Technology*, 99, 8156-8163, 2008.

SOMIARI, R.I.; BALOGH, E. **Properties of an extracellular glycosidase of *Aspergillus niger* suitable for removal of oligosaccharides from cowpea meal**. *Enzyme and Microbial Technology*. V.17, p.311-316, 1995.

SPIER, M. R. **Development of a bioprocess for production of a new *A. niger* FS3 phytase: studies of its purification and characterization**. Federal University of Paraná, 2008.

STEGGERDA, F.R.; DIMMICK, J.F. **Effect of bean diet on concentration of carbon dioxide in flatus**. *American Journal of Clinical Nutrition*. V.19. p.120-124, 1966.

SUAREZ, F. L.; SPRINGFIELD, J.; FURNE, J. K.; LOHRMANN, T.; KERR, P. S. & LEVITT, M. D. **Gas production in humans ingesting a soybean flour derived from beans naturally low in oligosaccharides**. *American Journal of Clinical Nutrition*. 69 (1), p. 135-139, 1999.

TALBOT G. & SYGUSCH J. **Purification and Characterization of Thermostable  $\beta$ -mannanase and  $\alpha$ -galactosidase from *Bacillus stearothermophilus***. *Applied and Environmental Microbiology*. V. 56, p. 3505-3510, 1990.

VIANA, S.F.; GUIMARÃES V.M.; JOSÉ I.C.; OLIVEIRA, M.G.A.; COSTA, N.M.B.; BARROS, E.G.; MOREIRA, M.A.; DE REZENDE, S.T. **Hydrolysis of oligosaccharides in soybean flour by  $\alpha$ -galactosidase**. *Food Chemistry*. V. 93, p. 665-670, 2005.

VIANA P.; REZENDE S.; MARQUES V.; TREVIZANO L.; PASSOS F.; OLIVEIRA M.; BEMQUERER M.; OLIVEIRA J.; GUIMARÃES V. **Extracellular  $\alpha$ -Galactosidase from *Debaryomyces hansenii* UFV-1 and Its Use in the Hydrolysis of Raffinose Oligosaccharides**. *J. Agric. Food Chem.* V. 54, p. 2385-2391, 2006.

WAGNER, J.R.; BECKER, R.; GUMBMANN, R.; OLSON, A.C. **Hydrogen production in the rat following ingestion of raffinose, stachyose, oligosaccharidesfree bean residue**. *The Journal of Nutrition*. v.56, p.466-470, 1976.

YAMAGUISHI C.T.; SANADA C.T.; GOUVÊA P.M.; PANDEY A.; WOICIECHOWSKI A.L.; PARADA J.L.; SOCCOL C.R. **Biotechnological process for producing black**

**bean slurry without stachyose.** Food Research International. V. 42, p. 425-429, 2009.

YOON, M. Y. & HWANG, H. **Reduction of soybean oligosaccharides and properties of  $\alpha$ -D-galactosidase from *Lactobacillus curvatus* R08 and *Leuconostoc mesenteroides* JK55.** Food Microbiology. V 25, p.815-823, 2008.

## APÊNDICES

APÊNDICE 1	– CÁLCULO DA ATIVIDADE DA $\alpha$ -GALACTOSIDASE (U /mL) .....	94
APÊNDICE 2	– ARTIGO PUBLICADO: UTILIZATION OF SOYBEAN VINASSE FOR $\alpha$ -GALACTOSIDASE PRODUCTION.....	95

**APÊNDICE 1 – CÁLCULO DA ATIVIDADE DA  $\alpha$ -GALACTOSIDASE (U/mL)**

- 1) A curva de calibração foi elaborada com soluções na faixa de 0 a 0,20  $\mu\text{mol}$  de p-nitrofenol (pNP) e respectivos valores de absorbâncias lidas no espectrofotômetro (410 nm). Foram plotados na curva: Abs. a 410 nm x concentração de pNP ( $\mu\text{moles}$ ).
- 2) Atividade da  $\alpha$ -galactosidase (U/mL) =  $\mu\text{moles}$  de p-nitrofenol liberado / volume do extrato enzimático (mL) / tempo de incubação (min)



## Utilization of soybean vinasse for $\alpha$ -galactosidase production

Cássia T.N. Sanada<sup>a</sup>, Susan G. Karp<sup>a</sup>, Michele R. Spier<sup>a</sup>, Augustus C. Portella<sup>a</sup>, Patrícia M. Gouvêa<sup>a</sup>, Caroline T. Yamaguishi<sup>a</sup>, Luciana P.S. Vandenberghe<sup>a</sup>, Ashok Pandey<sup>b</sup>, Carlos R. Soccol<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Bioprocess Engineering and Biotechnology Division, Federal University of Paraná, P.O. Box 19 011, Curitiba, Brazil

<sup>b</sup> Biotechnology Division, National Institute for Interdisciplinary Science and Technology (formerly Regional Research Laboratory), CSIR, Trivandrum 695 019, India

### ARTICLE INFO

Article history:  
Received 5 November 2008  
Accepted 29 January 2009

#### Keywords:

$\alpha$ -Galactosidase  
Soybean molasses  
Soybean vinasse  
Lactobacillus agilis

### ABSTRACT

The enzyme  $\alpha$ -galactosidase was produced by submerged fermentation using as substrate the soybean vinasse, a residue of the alcoholic fermentation of soybean molasses. Soybean molasses is a by-product of the protein-concentrate soybean meal production. The strain *Lactobacillus agilis* LPB 56 was selected among nine for presenting the highest enzymatic activity. The C:N relation in the vinasse-based inoculum medium was optimized and adjusted in 6 with yeast extract. The effects of soluble solids concentration in the fermentation medium, C:N relation and size of inoculum were investigated. Results demonstrated that the medium concentration of 30% soluble solids, with a C:N relation of 9, and size of inoculum of 25% (v/v) were the best conditions for  $\alpha$ -galactosidase production. The highest enzyme activity (11.07 U/mL) was achieved after 144 h of fermentation.

© 2009 Elsevier Ltd. All rights reserved.

## 1. Introduction

The enzyme  $\alpha$ -D-galactoside galactohydrolase (EC 3.2.1.22), also named  $\alpha$ -galactosidase or  $\alpha$ -gal, catalyzes the hydrolysis of  $\alpha$ -1,6-galactosidic bonds, releasing a D- $\alpha$ -galactose. These bonds are found in oligosaccharides such as melibiose, raffinose and stachyose (Fig. 1), which are associated to flatulence in monogastric animals and humans (Suarez et al., 1999). Human consumption of soy-derived products has been limited by the presence of these non-digestible oligosaccharides (NDOs), since most mammals, including man, lack pancreatic  $\alpha$ -galactosidase. However, such NDOs can be fermented by gas-producing microorganisms present in the cecum and large intestine, thus inducing flatulence and other gastrointestinal disorders in sensitive individuals (LeBlanc, Silvestroni, et al., 2004).  $\alpha$ -galactosidases are applied in biocatalytic processes to improve products destined to human nutrition and also as component in animal diets to increase digestibility and reduce the fermentation of NDOs.

Nutritional studies using commercial preparations of  $\alpha$ -galactosidase as supplements in the feed of monogastric animals demonstrated to significantly increase weight profit simultaneously with digestibility in swine and chickens. The food industry, especially the soy derivatives sector, has great interest in the reduction of galacto-oligosaccharides, which is resistant to heat and, therefore, are not eliminated during conventional processing (Said & Pietro, 2004). Mulimani, Thippeswamy, and Ramalingam (1997) reported that crude  $\alpha$ -galactosidase treatment on soybean flour reduced the

raffinose and stachyose contents by 90.4% and 91.9%, respectively. In the beet-sugar production process, this enzyme hydrolyses raffinose present in the beetroot boiled must, contributing to product crystallization.

$\alpha$ -Galactosidases are widely distributed in microorganisms, plants and animals (Said & Pietro, 2004). Microorganisms are capable of producing  $\alpha$ -galactosidases with high yield. The production of these enzymes by microorganisms as fungi, yeasts and bacteria consists of microorganism growth in a selective and generally liquid culture medium, containing an enzymatic activity inductive carbon source. Sugars as galactose, melibiose, raffinose and stachyose have already been described as inducers of  $\alpha$ -galactosidase activity (Rezende, Guimarães, Rodrigues, & Felix, 2005; Said & Pietro, 2004).

Lactic acid bacteria such as *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus buchneri* and *Lactobacillus reuteri* are able to hydrolyse  $\alpha$ -galacto-oligosaccharides into digestible carbohydrates during vegetable fermentations. Recently the characterization of genes involved in  $\alpha$ -galacto-oligosaccharides hydrolysis by *Lactococcus raffinolactis* was described (LeBlanc, Piard, Sesma, & Giori, 2005). Bacterial enzyme-producing species also include *L. fermentum* (Garro, Valdez, Oliver, & Giori, 1996) and *Bacillus stearothermophilus* (Gote, Umalkar, Khan, & Khire, 2004), and enzymes of fungal origin can be produced by *Aspergillus fumigatus* (Rezende et al., 2005), *Humicola* sp. (Kotwal, Gote, Sainkar, Khan, & Khire, 1998) and *Aspergillus niger* (Manzanares, Graaff, & Visser, 1998).

Vinasse is the waste-product of ethanol recovery by distillation. Ethanol is produced by the alcoholic fermentation of soybean molasses, an industrial residue, produced concomitantly with the

\* Corresponding author. Tel.: +55 41 33613191; fax: +55 41 33613272.  
E-mail address: [soccol@ufpr.br](mailto:soccol@ufpr.br) (C.R. Soccol).



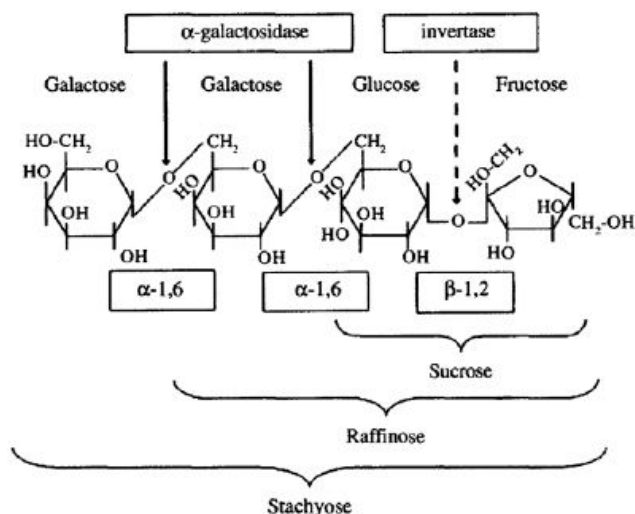


Fig. 1. Structures of the  $\alpha$ -galactosides in soybean, stachyose and raffinose (LeBlanc et al., 2004).

soybean protein-concentrate, that results from the extraction of sugars from de-oiled soybean meal. The soybean vinasse contains a considerable amount of residual sugars (oligomers linked by an  $\alpha$ -1,6 bond), according to Table 1. Currently, around 260 m<sup>3</sup> of vinasse are produced per day at a Brazilian soybean-processing company (Siqueira, 2006).

The main objective of this work was the development of a bioprocess for the production of  $\alpha$ -galactosidase using the soybean vinasse as substrate in submerged cultivation.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Preparation of the soybean vinasse medium for $\alpha$ -galactosidase production

Soybean vinasse was prepared from the alcoholic fermentation of soybean molasses. The molasses was supplied by a Brazilian soybean-processing company at the concentration of 70°Brix (% soluble solids, w/v), and for this reason it could be stored at room temperature. Soybean molasses was diluted with distilled water to 30°Brix and fermented by *Saccharomyces cerevisiae* (pressed yeast, 10 g/L) at 30 °C, 150 rpm for 24 h, using the New Brunswick Scientific-Bioflo 110 bioreactor (total volume of 14 L). The fermented broth was centrifuged at 20,000 g in a tubular centrifuge (Carl Padberg-Z41) to remove yeast cells. Ethanol was separated from the broth by vacuum evaporation at 78 °C in a roto-evaporator (TE-210-Tecnal), resulting in the vinasse. Sterilizations were performed in autoclave at 121 °C, 1 atm, for 15 min.

Table 1  
Average composition of soybean molasses and vinasse (Karp, 2007; Siqueira, 2006).

Component	Molasses (% dry basis)	Vinasse (% dry basis)
Stachyose	18.6	11.09
Raffinose	9.68	22.07
Sucrose	28.4	0
Glucose	0.243	0
Fructose	0.127	0
Galactose	0.254	1.84
Total Carbohydrates	57.3	35.0
Proteins	9.44	13.3
Lipids	21.2	27.8
Ash	6.36	9.24
Fibers	5.70	14.6

### 2.2. Screening of strains for $\alpha$ -galactosidase production

Eight strains of *Lactobacillus* and one of *Lactococcus* were tested for  $\alpha$ -galactosidase production from soybean vinasse. Strains were purchased from the culture collections NRRL (Northern Regional Research Laboratory), FAT (Fundação André Tosello) and DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen). Some of the strains were available only at the culture collection of the Laboratory of Biotechnological Processes (LPB) - Federal University of Paraná. The nine strains, stored in a solution of MRS (Man-Rogosa-Sharpe) medium and 25% glycerol at -80 °C, were reactivated in sterile MRS broth (lactobacilli) or TS (Trypticase soy) broth enriched with 0.3% yeast extract (*Lactococcus*) and statically incubated at the optimum temperature (45 °C for *Lactobacillus delbrueckii* and 30 °C for other strains). After microorganism growth (visual analysis), this broth was transferred to the inoculum medium (MRS or TS broth) at the proportion of 10% (v/v), which was incubated for 12 h at the optimum temperature and 120 rpm. Selection of the strain was performed in soybean vinasse with 10% soluble solids, pH 6.5, inoculated at 10% (v/v), in 250 mL Erlenmeyer flasks incubated at the optimum temperature and 120 rpm for 96 h. Extracellular enzymatic activity was assayed at 48, 72 and 96 h.

### 2.3. Optimization of inoculum preparation: effect of different nitrogen sources and C:N relations on cellular growth and enzyme production

Inoculum preparation was tested in MRS and vinasse-based media. The selected strain was reactivated in sterile MRS broth. The vinasse medium was prepared at 10°Brix. Cellular growth curve was determined using 250 mL Erlenmeyer flasks incubated in shaker at 120 rpm, 30 °C, for 24 h. Quantification of cells was performed every 4 h. Enzymatic activity was measured in the fermented broth (10°Brix, 2% CaCO<sub>3</sub>, 10% inoculum) after 72 h (fermentation parameters defined according to Karp, 2007). In order to optimize the vinasse-based inoculum medium, supplementation with five nitrogen sources including organic (proteose peptone, yeast extract and urea) and inorganic (ammonium nitrate and ammonium sulphate) were evaluated, at different C:N relations (1, 3, 6, 9, 11 and 13). Cellular concentration was evaluated in the inoculum medium after 12 h. These inocula were transferred to fermentation media (10°Brix, 2% CaCO<sub>3</sub>, 10% inoculum) and  $\alpha$ -galactosidase activity was tested after 72 h.

### 2.4. Optimization of culture conditions and medium composition

#### 2.4.1. Screening of culture conditions and medium compositions affecting $\alpha$ -galactosidase production using the Plackett-Burman Design

In order to determine which variables significantly affect  $\alpha$ -galactosidase production, a Plackett-Burman Design was employed. Seven variables (including one dummy variable) were screened in eight experimental runs. All six variables (temperature, initial pH, rotation velocity, size of inoculum, soluble solids percentage and C:N relation) were studied at two levels. The statistical software package "Statistica 5.0" was used for experimental data analysis.

#### 2.4.2. Optimization of culture conditions and medium compositions affecting $\alpha$ -galactosidase production using the Central Composite Design

A 2<sup>3</sup> Central Composite Design with three central points and six axial points, totalizing 17 experimental runs, was employed to study the effect of soluble solids concentration, size of inoculum and C:N relation on  $\alpha$ -galactosidase production, as shown in Table 2. Vinasse was concentrated in the roto-evaporator to reach final

**Table 2**

Central Composite Design for testing soluble solids concentration, inoculum's size and C:N relation.

Variables	Level				
	−1.68	−1	0	+1	+1.68
Soluble solids (°Brix)	22	25	30	35	38
Inoculum (% v/v)	8	15	25	35	42
C:N relation	2	6	9	12	14

concentrations of 22, 25, 30, 35 and 38°Brix considering the dilution after inoculation. Sizes of inoculum were 8, 15, 25, 35 and 42% (v/v). The fermentation medium was supplemented with the optimum nitrogen source (see Section 2.3.) at the following C:N relations: 2, 6, 9, 12, 14. The pH of vinasse was adjusted to 6.5 with KOH 5 N and 6% CaCO<sub>3</sub> was added (Karp, 2007). Sterilization was performed at 121 °C, 1 atm, 15 min. Inoculum was prepared in the vinasse supplemented with optimum nitrogen source and C:N relation. Fermentation assays were conducted in 250 mL Erlenmeyer flasks filled with 175 mL, incubated at 30 °C, 120 rpm, for 72 h.

## 2.5. Production of $\alpha$ -galactosidase in bioreactor under optimized conditions

The process developed in 250 mL Erlenmeyer flasks was transferred to a bioreactor (New Brunswick Scientific - Bioflo 110) with 14 L of total volume. The bioreactor had agitation, pH and temperature controlled. Inoculum was prepared in the vinasse at the optimum C:N relation. Fermentation was conducted under optimized conditions of soluble solids percentage, size of inoculum and C:N relation. The pH was continuously controlled at 6.5 by the addition of KOH 5 N, besides the addition of 1% CaCO<sub>3</sub> at the beginning of fermentation. After incubation at 30 °C, 150 rpm for 192 h, the supernatant, separated by centrifugation, was used as a source of extracellular enzyme and the biomass as source of intracellular enzyme.

## 2.6. Analytical methods

### 2.6.1. Determination of soluble solids percentage (°Brix), cellular concentration and disruption of cells

The percentage of soluble solids (°Brix) was measured with a portable refractometer for sugar (Instrutherm, model RT-30 ATC, reading range 0–30°Brix). Cellular concentration in CFU/mL (colony forming units per mL) was quantified by the method of viable cells plate counting (Hoben & Somasegaran, 1982). Samples were centrifuged at 10,000 g for 10 min and the culture supernatants were assayed for extracellular  $\alpha$ -galactosidase activity. For the intracellular  $\alpha$ -galactosidase fraction, the cell pellet was washed

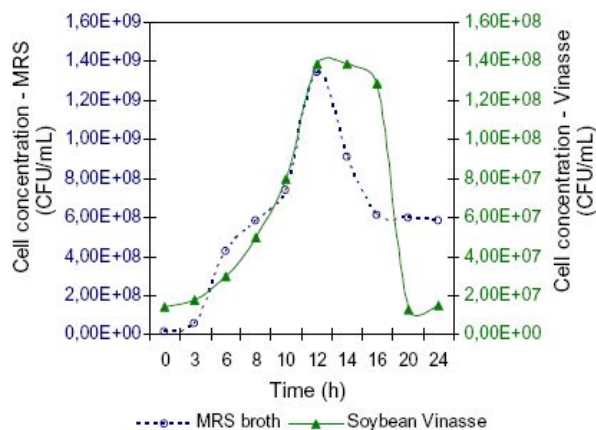
with potassium phosphate buffer at pH 7.0 and then suspended in the same buffer (Yoon & Hwang, 2008). Disruption of cells was performed with an ultrasonic processor (Bandelin, Sonopuls HD2070). The process was conducted in eight cycles of 30 s for five times, on ice, with a power input of 40%.

### 2.6.2. Enzymatic assay

$\alpha$ -galactosidase activity was determined using a synthetic substrate, p-nitrophenyl- $\alpha$ -D-galactopyranoside (pNPGal) (Oliveira et al., 2005). The assay system contained 750  $\mu$ L of 100 mM sodium acetate buffer, pH 5.0, 100  $\mu$ L of enzyme preparation and 250  $\mu$ L 2 mM p-nitrophenyl- $\alpha$ -D-galactopyranoside. The reaction was conducted for 15 min at 37 °C and stopped by the addition of 1 mL 0.5 M sodium carbonate. The amount of p-nitrophenol (pNP) released was measured by absorbance at 410 nm in spectrophotometer (Visible-UV-1601 PC, Shimadzu). In order to calculate the enzyme activity a calibration curve was performed over the range of 0–0.20  $\mu$ mol p-nitrophenol (pNP). One unit (U) of  $\alpha$ -galactosidase activity was defined as the amount of enzyme which released 1  $\mu$ mol of p-nitrophenol per min under standard assay conditions.

### 2.6.3. Quantification of sugars and lactic acid

Sugars and lactic acid were quantified by HPLC (High Performance Liquid Chromatography, Shimadzu Liquid Chromatograph), using the Aminex HPX-87 H column, mobile phase H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 4 (Merck, P.A., 95–97%) 5 mM, 0.6 mL/min, 60 °C. The samples were diluted with H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-acidified ultra pure water according to their concentrations (from 10 to 20-fold), centrifuged at 10,000 g and filtered with 0.22  $\mu$ m PVDF membranes, diameter 13 mm (Millipore). Total sugars concentration was calculated by the sum of the concentrations of individual sugars. Standards for HPLC analysis were:



**Fig. 2.** Cellular growth (CFU/mL) of the microorganism *L. agilis* LPB 56 in MRS broth and soybean vinasse at 10°Brix. Average standard deviation was 7%.

**Table 3**

Extracellular  $\alpha$ -galactosidase activity for nine different strains of lactic acid bacteria. Values in parentheses represent average standard deviations.

Strains	$\alpha$ -Gal activity (U/mL)		
	48 h	72 h	96 h
<i>L. paracasei</i> LPB E1	0.156 (0.008)	0.205 (0.006)	0.209 (0.009)
<i>L. pentosus</i> NRRL B-227	0.081 (0.004)	0.198 (0.003)	0.145 (0.006)
<i>L. plantarum</i> NRRL B-4496	0.063 (0.003)	0.165 (0.007)	0.201 (0.01)
<i>L. delbrueckii</i> FAT 0846	0.019 (0.0007)	0.175 (0.002)	0.186 (0.008)
<i>L. fermentum</i> LPB 7	0.094 (0.006)	0.218 (0.0075)	0.150 (0.008)
<i>L. agilis</i> LPB 56	0.393 (0.03)	0.545 (0.025)	0.498 (0.03)
<i>L. casei rhamnosus</i> LPB H19	0.134 (0.008)	0.106 (0.009)	0.109 (0.004)
<i>L. salivarius</i> NRRL B-1949	0.000 (0)	0.003 (0.0001)	0.090 (0.004)
<i>L. raffinolactis</i> DSM 20443	0.054 (0.004)	0.098 (0.003)	0.074 (0.003)

**Table 4**

Cellular production ( $\approx$ 10 CFU/mL) in the vinasse after 12 h for different nitrogen sources and C:N relations. Average standard deviation was 6.7%.

Nitrogen source	C:N relation					
	1	3	6	9	11	13
Ammonium sulphate	0.025	1.6	3.5	1.3	1.0	0.20
Ammonium nitrate	0.012	1.2	2.8	1.1	1.2	0.16
Yeast extract	0.037	3.8	5.6	0.96	1.3	0.17
Peptone proteose	0.0088	0.74	2.2	0.92	1.3	0.078
Urea	0.012	0.62	1.2	0.89	0.96	0.085

Stachyose tetrahydrate 98.5% (Acros Organics); D(+)-raffinose pentahydrate 99+% (Acros Organics); D(+)-glucose, anhydrous ACS, (Acros Organics); D(+)-fructose P.A. (Vetec); D(+)-galactose P.A. (Vetec) and L-lactic acid 85.0% P.A. (Synth).

### 3. Results and discussion

#### 3.1. Screening of strains for $\alpha$ -galactosidase production

Table 3 shows the results of the microorganisms screening test. Analysis of variance at the level of 0.05 demonstrated that the response presented by *Lactobacillus agilis* LPB 56 was significantly higher than the other averages, so this strain was selected for the subsequent studies. There is no literature report about  $\alpha$ -galactosidase production by *L. agilis*.

#### 3.2. Optimization of inoculum preparation

##### 3.2.1. Kinetics of cellular growth in MRS and vinasse media

MRS broth and soybean vinasse were compared as media for cellular production, aiming at the substitution of the synthetic medium for inoculum preparation. The kinetics of cellular growth for the strain *L. agilis* LPB 56 is shown in Fig. 2 for both media.

Cellular growth in the vinasse presented a satisfactory result of the order of  $10^8$  CFU/mL, the result for MRS medium being of around  $10^9$  CFU/mL. The stationary growth phase was about 4 h longer for the vinasse. The sudden decline in cellular viability, without a stationary phase, was already reported by Karp (2007) for the strain *L. agilis* LPB 56 grown in MRS medium. Even in the vinasse, the reduction in viable cells concentration was very expressive after 16 h, and could possibly be attributed to pH reduction, as a result of lactic acid production.

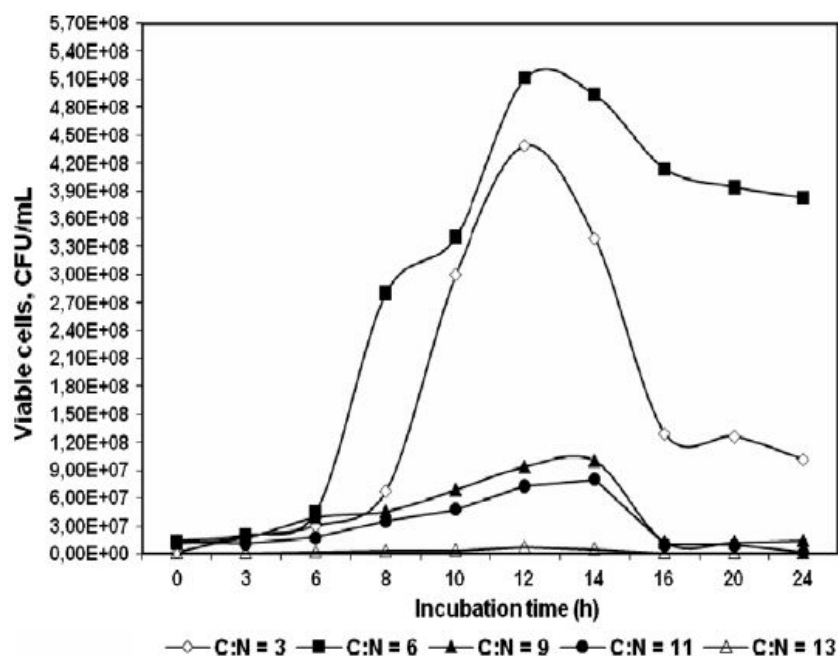


Fig. 3. Growth kinetics of *L. agilis* LPB 56 in the vinasse-based inoculum supplemented with yeast extract at different C:N relations. Average standard deviation was 9.1%.

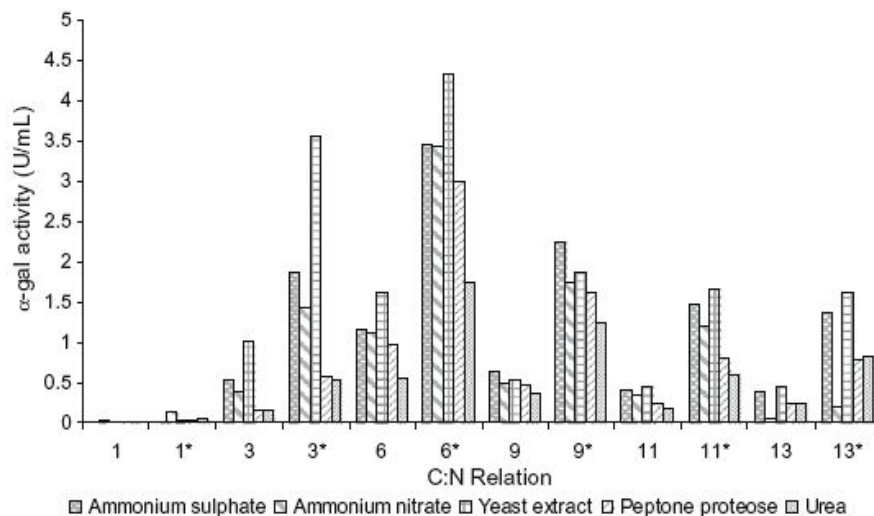


Fig. 4.  $\alpha$ -galactosidase activity in the fermentation medium after 72 h for different nitrogen sources and C:N relations in the inoculum. Average standard deviation was 5.4%.

\*Refers to total activity (intracellular + extracellular).

Extracellular enzymatic activity presented after 72 h in the fermentation medium was 8% higher for the medium inoculated with 10% (v/v) of vinasse (average of 0.586 U/mL). Intracellular activity was assayed after cells disruption, and presented a value of 1.52 U/mL. So, it was concluded that the selected strain *L. agilis* LPB 56 produced intra and extracellular  $\alpha$ -galactosidase. The utilization of vinasse as inoculum medium, besides reducing fermentation costs, provided the beginning of strain adaptation in fermentation medium. Subsequently, C:N relation was optimized in order to improve cellular growth in the vinasse.

### 3.2.2. Supplementation of vinasse-based inoculum medium with different nitrogen sources and C:N relations

Results presented in Table 4 demonstrated that, among the inorganic and organic nitrogen sources assayed, yeast extract at the C:N relation of 6 provided the best cellular production in the inoculum medium. The kinetics of cell growth was evaluated for the addition of yeast extract. Results in Fig. 3 confirmed that the

maximum viable cells concentration (around  $5 \times 10^8$  CFU/mL) was obtained for the proportion of C:N 6, at around 12 h. The second maximum cellular production was obtained for C:N 3, but it represents higher nitrogen source addition. There was no significant difference among the proportions 9 and 11 (around  $10^7$  CFU/mL). The proportion C:N 1 resulted in a viable cells concentration of around  $10^6$  CFU/mL (data not shown in Fig. 3).

According to the Tukey test,  $\alpha$ -galactosidase activity (1.60 U/mL extracellular and 4.33 U/mL total) presented by the strain *L. agilis* LPB 56 when using yeast extract and C:N of 6 was significantly higher than the other averages (Fig. 4). The same condition was assayed by Gote et al. (2004) that reported an  $\alpha$ -galactosidase activity of 1.15 U/mL when using 0.5% of yeast extract as nitrogen source.

### 3.3. Optimization of culture conditions and medium composition

#### 3.3.1. Screening of culture conditions and medium compositions affecting $\alpha$ -galactosidase production using the Plackett-Burman Design

The values of temperature and pH were chosen according to literature reported values (Roissart & Luquet, 1994). Rotation, soluble solids concentration and size of inoculum were defined based on parameters utilized by Karp (2007). C:N relations were defined according to the inoculum preparation test (Section 3.2.2.). Preliminary experiments revealed that supplementation of mineral salts in the fermentation medium ( $K_2HPO_4$ ,  $KH_2PO_4$ ,  $MnSO_4 \cdot H_2O$ ,  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ ,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ,  $CaCl_2$  and  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ ) did not significantly affect  $\alpha$ -galactosidase production (data not shown). Cho-

**Table 5**

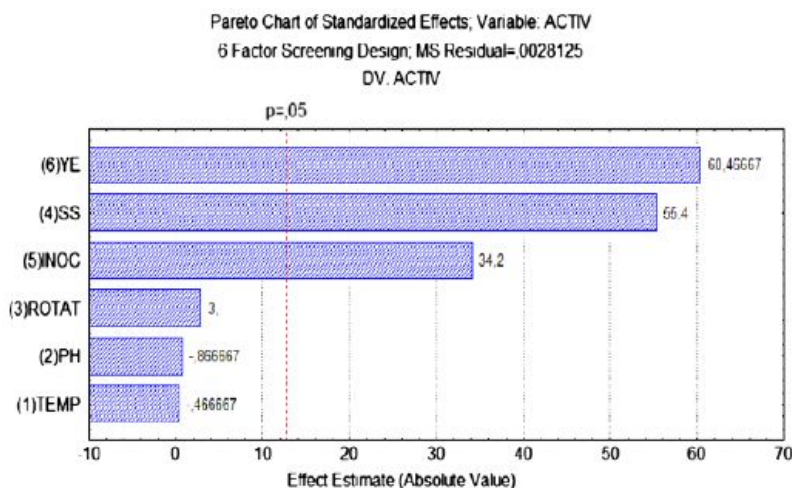
Coded and real values of culture conditions and medium compositions used for Plackett-Burman Design.

Level		−1	+1
Temperature (°C)	$X_1$	25	35
pH	$X_2$	6	7
Rotation (rpm)	$X_3$	110	130
Soluble solids (°Brix)	$X_4$	10	20
Inoculum (% v/v)	$X_5$	10	20
Yeast extract (C:N relation)	$X_6$	3	6

**Table 6**

Results obtained for the Plackett-Burman Design:  $\alpha$ -galactosidase activities for different culture conditions and medium compositions after 72 h of fermentation.

Run	Temp. (°C)	pH	Rotation (rpm)	Soluble solids (°Brix)	Inoculum (% v/v)	Yeast extract (C:N)	Dummy	Total $\alpha$ -gal activity (U/mL)
	$X_1$	$X_2$	$X_3$	$X_4$	$X_5$	$X_6$	$X_7$	
1	−1	−1	−1	−1	−1	−1	1	2.53
2	−1	−1	+1	−1	+1	+1	−1	6.23
3	−1	+1	−1	+1	−1	+1	−1	6.88
4	−1	+1	+1	+1	+1	−1	1	5.97
5	+1	−1	−1	+1	+1	−1	−1	5.91
6	+1	−1	+1	+1	−1	+1	1	6.97
7	+1	+1	−1	−1	+1	+1	1	6.03
8	+1	+1	+1	−1	−1	−1	−1	2.63



**Fig. 5.** Pareto chart for screening of significant effects on  $\alpha$ -galactosidase production, demonstrating the positive effect of variables 4 (soluble solids), 5 (size of inoculum) and 6 (C:N relation). Significance of effects is determined by the Student's t test at the confidence level of 95%, and represented by the cut-off line at  $p=0.05$ .



**Table 7**

$\alpha$ -galactosidase activities obtained after 72 h of fermentation for different culture conditions and medium compositions used for the Central Composite Design.

Run	Soluble solids% (°Brix)	Inoculum (% v/v)	Yeast extract (C:N relation)	Total $\alpha$ -gal activity (U/mL)
1	25	15	6	4.87
2	35	15	6	0.873
3	25	35	6	4.39
4	35	35	6	2.38
5	25	15	12	4.64
6	35	15	12	0.788
7	25	35	12	4.02
8	35	35	12	1.90
9	22	25	9	6.98
10	38	25	9	2.13
11	30	8	9	2.86
12	30	42	9	6.52
13	30	25	2	2.65
14	30	25	14	7.02
15	30	25	9	7.55
16	30	25	9	7.31
17	30	25	9	7.60

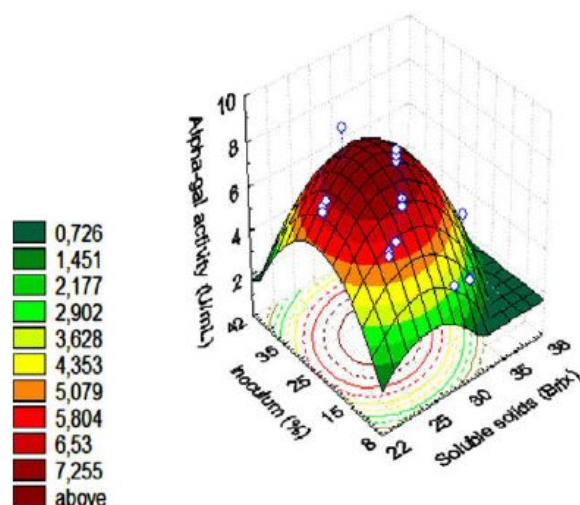
sen levels are shown in Table 5.  $\alpha$ -galactosidase activities obtained for the different factors and levels are presented in Table 6.

According to the pareto chart of the Plackett-Burman Design (Fig. 5), three variables including soluble solids percentage ( $X_4$ ), size of inoculum ( $X_5$ ) and C:N relation ( $X_6$ ) significantly influenced  $\alpha$ -galactosidase activity, increasing its value when their levels were increased. These variables were subsequently investigated for their optimal concentrations.

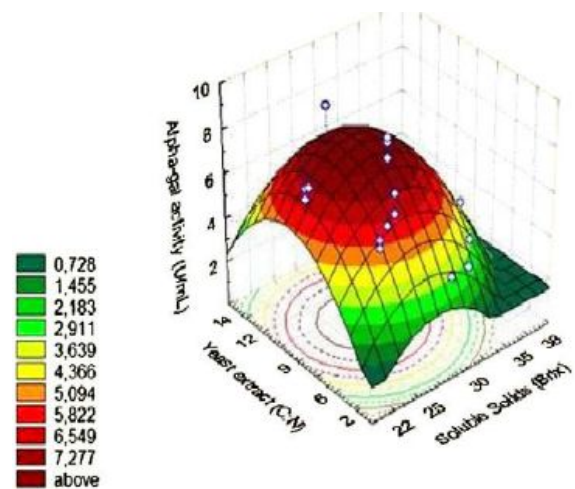
### 3.3.2. Optimization of culture conditions and medium compositions affecting $\alpha$ -galactosidase production using the Central Composite Design

The levels of soluble solids concentration and size of inoculum were increased in relation to the previous experiment, since the best reported values for lactic acid production from the soybean vinasse by the strain *L. agilis* LPB 56 were 30% and 25%, respectively (Karp, 2007). Levels of C:N relation were chosen in order to compare the optimum relation previously obtained (C:N 6, Section 3.2.2.) and the C:N relation in non-supplemented fermentation medium. Values are presented in Table 7.

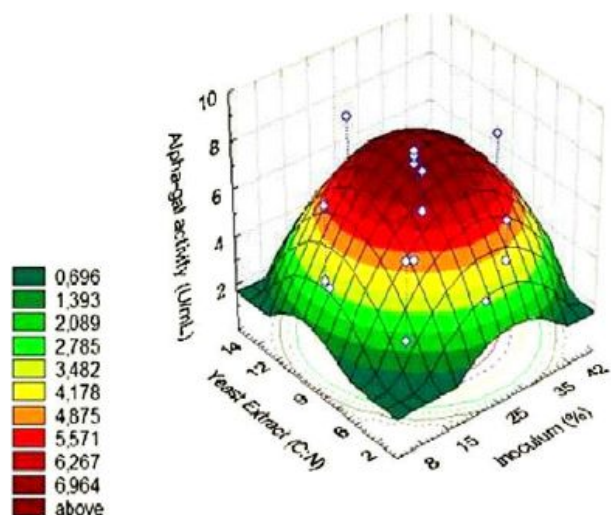
The response surfaces presented in Figs. 6–8, described by the second order polynomial Eq. (1) for coded values, show the results



**Fig. 6.** Response surface plot described by the model, showing the effect of soluble solids (°Brix) and size of inoculum (% v/v) on  $\alpha$ -galactosidase production.



**Fig. 7.** Response surface plot described by the model, showing the effect of soluble solids (°Brix) and yeast extract (C:N relation) on  $\alpha$ -galactosidase production.



**Fig. 8.** Response surface plot described by the model, showing the effect of size of inoculum (% v/v) and yeast extract (C:N relation) on  $\alpha$ -galactosidase production.

**Table 8**Identification of significant variables ( $p < 0.05$ ) for  $\alpha$ -galactosidase production using Central Composite Design.

Factor	Coefficients	Standard error	t-Value	p-Value
Soluble solids (°Brix) (L)	-1.47507	0.423785	•3.48070	0.010257
Soluble solids (°Brix) (Q)	-1.38119	0.466875	•2.95838	0.021154
Inoculum% (Q)	-1.33336	0.466875	•2.85593	0.024480
Yeast extract (C:N) (Q)	-1.28199	0.466875	•2.74589	0.028674

**Table 9**Experiments for the verification of the predicted model of  $\alpha$ -galactosidase production. Results represent the average of the duplicates, with a standard deviation below 10%.

Run	Soluble solids% (°Brix)	Inoculum (% v/v)	Yeast extract (C:N relation)	Predicted (U/mL)	Experimental (U/mL)
1	25	25	12	5.81	5.67
2	27.5	20	11.5	6.47	6.09
3	30	15	9	4.92	6.65
4	32.5	30	7.5	4.12	3.87
5	35	35	6	0	1.95

**Table 10**Kinetic study of  $\alpha$ -galactosidase, biomass and lactic acid production and sugar consumption. Results represent the average of two experiments, with a standard deviation below 10%.

Time (h)	Biomass (g/L) <sup>a</sup>	Total Sugar (g/L)	Lactic acid (g/L)	Extracellular activity (U/mL)	Total activity (U/mL)	Specific activity (U/mg)
0	0.272	105.6	7.826	0	0.03487	0.2019
24	3.92	53.03	48.44	0.324	4.939	35.05
48	6.83	26.49	66.79	2.111	6.839	46.32
72	7.05	5.704	72.20	3.002	7.374	44.78
96	7.77	4.924	71.29	3.356	7.600	43.93
120	7.46	4.744	72.54	3.652	7.545	41.25
144	8.22	4.432	70.30	5.925	11.07	51.97
168	8.12	4.432	73.57	3.480	9.703	49.41
192	8.26	3.952	73.65	3.301	10.1	44.83

<sup>a</sup> Dry weight.

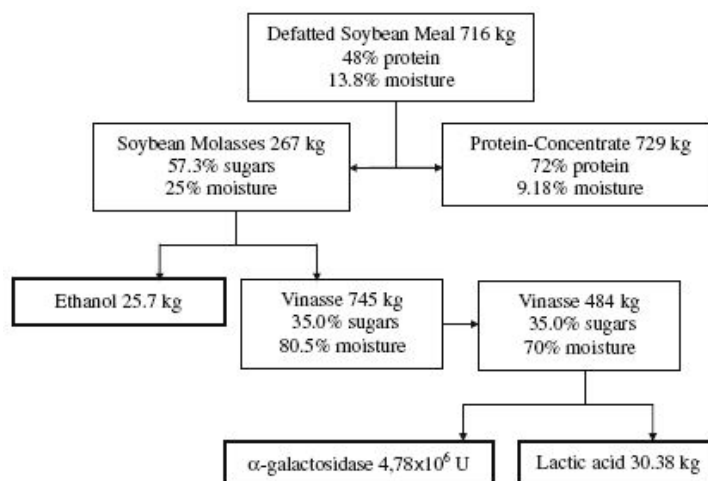
for total (extracellular + intracellular)  $\alpha$ -galactosidase activity (U/mL) when soluble solids concentration, size of inoculum and C:N relation were varied, using the strain *L. agilis* LPB 56. All response surfaces show that increasing the levels of the three aforementioned variables was beneficial for  $\alpha$ -galactosidase production until a certain point. Subsequent increases caused a negative effect on enzyme production. This was expected for the variable soluble solids, once the effect of substrate inhibition is well known. For the size of inoculum, this result is in accordance with previous studies on lactic acid production (Karp, 2007). It was observed that the maximum  $\alpha$ -galactosidase production (7.60 U/mL) was reached when the soluble solids concentration was 30%, size of inoculum was 25% (v/v) and C:N relation was 9 (non-supplemented medium).

$$\text{Activity (U/mL)} = 7.589 - 2.95013 \cdot [\text{Soluble solids}] - 2.76238 \cdot [\text{Soluble solids}]^2 - 2.66672 \cdot [\text{Inoculum\%}]^2 - 2.56397 \cdot [\text{C : N relation}]^2$$

According to Table 8, the significant variable that more affected the response was soluble solids% (°Brix), for presenting the highest effect (absolute value) in the quadratic term (2.95838). The model revealed a correlation coefficient ( $R^2$ ) of 0.81647. Verification of the model was performed in Erlenmeyer flasks (five experiments, in duplicates) for conditions within the experimental range. Results are presented in Table 9. According to the calculated deviations, the average relative deviation of the model in relation to real values was 25%.

### 3.4. Production of $\alpha$ -galactosidase in bioreactor under optimized conditions

The kinetic study of  $\alpha$ -galactosidase production in bioreactor under optimized conditions is presented in Table 10. The highest enzymatic activity (11.07 U/mL) was reached after 144 h of fermentation. It was observed that enzymatic activity did not drop after 72 h, as for the previous experiments. This was probably due to continuous pH control, besides  $\text{CaCO}_3$  addition at the begin-

**Fig. 9.** Mass balance of  $\alpha$ -galactosidase production from soybean vinas, based on 1 ton of soybean. Percentages in dry basis.

ning of fermentation. The maximum  $\alpha$ -galactosidase activity was obtained during the stationary phase, and the intracellular fraction had considerably higher enzyme activity than the extracellular fraction, which is in accordance with the results obtained by Yoon and Hwang (2008). Improvements in product yields as recorded in this investigation (from 7.60 U/mL in shake-flasks to 11.07 U/mL in the fermenter) are expected in the fermenter due to better control of process parameters. The enhancement in  $\alpha$ -galactosidase activity could be mainly attributed to maintenance of pH.

Some literature reported values for  $\alpha$ -galactosidase activity include 2.0 U/mL (extracellular) after 24 h in submerged fermentation by *B. stearothermophilus* using soybean meal (Gote et al., 2004) and 5.0 U/mL after 24 h for submerged fermentation by *L. fermentum* in synthetic raffinose-based medium (LeBlanc, Garro, & Giori, 2004).

### 3.5. Mass balance

Fig. 9 shows the mass balance of an integrand process, in which the main residues of the soybean protein-concentrate processing are employed as substrates for ethanol,  $\alpha$ -galactosidase and lactic acid production. Values were calculated from real data obtained at a soybean-processing company, based on the processing of one ton of soybean (in natura). The production of defatted soybean meal, protein-concentrate and ethanol from molasses are already implemented at industrial scale. The steps including vinasse concentration (from 80.5% to 70% moisture) and the concomitant production of  $\alpha$ -galactosidase and lactic acid were developed at laboratory scale.

## 4. Conclusions

This work demonstrated that it is possible to produce  $\alpha$ -galactosidase from the soybean vinasse with satisfactory yields (7.60 U/mL in shake-flasks and 11.07 U/mL in the fermenter). Experimental investigations indicated that fermentation should be carried out with the medium at 30% (w/v) soluble solids, inoculated with 25% (v/v) soybean vinasse (C:N 9) and for 144 h, when using the selected strain *L. agilis* LPB 56.

According to the results already obtained, the process shows interesting perspectives for the exploitation of an agricultural residue that could represent an environmental problem, since the vinasse produced by the fermentation of soybean molasses presents a biochemical oxygen demand value of 77.2 gO<sub>2</sub>/L (Siqueira et al., 2008). The possibility of producing a high commercial value product from a costless residue is beneficial for industrial develop-

ment, since the majority of the studies are developed for synthetic media.

## References

- Garro, M., Valdez, G. F., Oliver, G., & Giori, G. S. (1996). Purification of  $\alpha$ -galactosidase from *Lactobacillus fermentum*. *Journal of Biotechnology*, 45, 103–109.
- Gote, M., Umalkar, H., Khan, I., & Khire, J. (2004). Thermostable  $\alpha$ -galactosidase from *Bacillus stearothermophilus* (NCIM 5146) and its application in the removal of flatulence causing factors from soymilk. *Process Biochemistry*, 39, 1723–1729.
- Hoben, H. J., & Somasegaran, P. (1982). Comparison of the pour, spread, and drop plate methods for enumeration of *Rhizobium* spp. in inoculants made from presterilized peat. *Applied and Environmental Microbiology*, 44(5), 1246–1247.
- Karp, S. G. (2007). Production of L-lactic acid from the soybean vinasse. Master dissertation, Federal University of Paraná/Universities of Provence and of the Mediterranean Sea, Brazil/France.
- Kotwal, S. M., Gote, M. M., Sainkar, S. R., Khan, M. I., & Khire, J. M. (1998). Production of  $\alpha$ -galactosidase by thermophilic fungus *Humicola* sp. in solid-state fermentation and its application in soymilk hydrolysis. *Process Biochemistry*, 33, 337–343.
- LeBlanc, J. G., Garro, M. S., & Giori, G. S. (2004). Effect of pH on *Lactobacillus fermentum* growth, raffinose removal,  $\alpha$ -galactosidase activity and fermentation products. *Applied Microbiology Biotechnology*, 65, 119–123.
- LeBlanc, J. G., Piard, J. C., Sesma, F., & Giori, G. S. (2005). *Lactobacillus fermentum* CRL 722 is able to deliver active  $\alpha$ -galactosidase activity in the small intestine of rats. *FEMS Microbiology Letters*, 248, 177–182.
- LeBlanc, J. G., Silvestroni, A., Connes, C., Juillard, V., Giori, G. S., Piard, J. C., et al. (2004). Reduction of non-digestible oligosaccharides in soymilk: Application of engineered lactic acid bacteria that produce  $\alpha$ -galactosidase. *Genetics and Molecular Research*, 3, 432–440.
- Manzanares, P., Graaff, L. H., & Visser, J. (1998). Characterization of galactosidases from *Aspergillus niger*: Purification of a novel  $\alpha$ -galactosidase activity. *Enzyme and Microbial Technology*, 22, 383–390.
- Mulimani, V. H., Thippeswamy, S., & Ramalingam (1997). Enzymatic degradation of oligosaccharides in soybean flours. *Food Chemistry*, 59(2), 279–282.
- Oliveira, G., Guimarães, V. M., Lima, E. E., Fialho, L. S., Oliveira, M. G. A., & Rezende, S. T. (2005). Purificação e caracterização de  $\alpha$ -galactosidases de sementes de *Platymiscium pubescens* micheli. *Revista árvore*, 29, 535–543.
- Rezende, S. T., Guimarães, V. M., Rodrigues, M. C., & Felix, C. R. (2005). Purification and characterization of an  $\alpha$ -galactosidase from *Aspergillus fumigatus*. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 48(2), 195–202.
- Roissart, H., & Luquet, F. M. (1994). *Bactéries Lactiques - Aspects fondamentaux et technologiques*. Uriage: Loriga.
- Said, S., & Pietro, R. C. L. R. (2004). *Enzimas como Agentes Biotecnológicos*. Ribeirão Preto: Legis Summa.
- Siqueira, P. F. (2006). Production of bio-ethanol from soybean molasses by *Saccharomyces cerevisiae*. Master dissertation, Federal University of Paraná/Universities of Provence and of the Mediterranean Sea, Brazil/France.
- Siqueira, P. F., Karp, S. G., Carvalho, J. C., Sturm, W., Rodríguez-Léon, J. A., Tholozan, J. L., et al. (2008). Production of bio-ethanol from soybean molasses by *Saccharomyces cerevisiae* at laboratory, pilot and industrial scales. *Bioresource Technology*, 99, 8156–8163.
- Suarez, F. L., Springfield, J., Furne, J. K., Lohrmann, T., Kerr, P. S., & Levitt, M. D. (1999). Gas production in humans ingesting a soybean flour derived from beans naturally low in oligosaccharides. *American Journal of Clinical Nutrition*, 69(1), 135–139.
- Yoon, M. Y., & Hwang, H. (2008). Reduction of soybean oligosaccharides and properties of a  $\beta$ -galactosidase from *Lactobacillus curvatus* R08 and *Leuconostoc mesenteroides* JK55. *Food Microbiology*, 25, 815–823.